

**Untersuchungen zur Farbreaktion von Amilorid, Chlorhexidin
und Proguanil mit Hypobromit**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von

Silke Huth

aus Wolfsburg

1. Referent:

Prof. Dr. K. Görlitzer

2. Referent:

Prof. Dr. H. Wätzig

eingereicht am :

17.05. 2004

mündliche Prüfung (Disputation) am :

20.07. 2004

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

K. Görlitzer, S. Huth, P.G. Jones, E. Gößnitzer, W. Wendelin, Zur Farbreaktion von Amiloridhydrochlorid Ph. Eur., Sci. Pharm. **2001**, 69, 275-287

K. Görlitzer, S. Huth, E. Gößnitzer, W. Wendelin, Abbauprodukte von Amiloridhydrochlorid, Sci. Pharm. **2004**, 72, 109-120

K. Görlitzer, S. Huth, P.G. Jones, Zur Farbreaktion von Chlorhexidin und Proguanil mit Hypobromit, Pharmazie **2005**, 60, im Druck (P 4109)

*Wer nie verliert,
hat den Sieg nicht verdient!*

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. K. Görlitzer

am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig
angefertigt. Für seine ständige Hilfsbereitschaft, Unterstützung und interessanten

Diskussionen danke ich Herrn Prof. Dr. K. Görlitzer besonders herzlich.

Herrn Professor Dr. Hermann Wätzig gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferates.

Frau Professor Dr. Edith Gößnitzer und Herrn Professor Dr. Winfried Wendelin, Institut für
Pharmazeutische Chemie der Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich, gilt mein ganz besonderer
Dank für ihr großes Engagement bei der Aufnahme und Bearbeitung von HMBC- und NOE-
Differenzspektren sowie die Hilfe bei der Interpretation der EI-Massenspektren.

Danksagungen

Mein Dank geht an alle ehemaligen und jetzigen Kollegen, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und vor allem tröstende Worte fanden, wenn nicht immer alles den gewünschten Verlauf nahm.

Besonders namentlich erwähnt seien hier meine Praktikumskollegen Dr. Lutz Preu, Dr. Giorgio Badia, Heidi Köppel und Björn Gabriel, denen ich für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit während der Durchführung unserer Lehraufgaben und die unterstützenden Gespräche fachlicher als auch privater Natur danken möchte.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die uneingeschränkte Unterstützung und ständige Begleitung auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken.

für meine Eltern

und

Tobi

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Problemstellung	5
3 Theoretischer Teil	7
3.1 Amiloridhydrochlorid	7
3.1.1 Identitätsreaktion Amiloridhydrochlorid	7
3.1.2 Strukturaufklärung der fluoreszierenden Substanz	10
3.1.2.1 Theoretische Reaktionsprodukte	10
3.1.2.2 Ableitung der Struktur durch Vergleich von Massenspektren	14
3.1.2.3 Ableitung der Struktur des Farbstoffes durch Vergleich von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Referenzsubstanzen	15
3.1.2.4 Röntgenstrukturanalyse	17
3.1.2.5 2D-NMR-Untersuchungen vom Farbstoff	19
3.1.3 Derivatisierungsversuche	21
3.1.4 Zersetzungsprodukte von Amiloridhydrochlorid in wässriger Lösung	25
3.1.4.1 Synthese der Verbindungen 3 und 4 ausgehend von Amilorid (1)	25
3.1.4.2 Synthese der Verbindung 5 ausgehend von Amilorid	28
3.1.4.3 pH-unabhängige Synthese der Verbindung 5	33
3.1.4.4 Synthese der Verbindung 5	37
3.2 Chlorhexidindihydrochlorid	44
3.2.1 Identitätsreaktion Chlorhexidindihydrochlorid	44
3.2.1.1 Hinweise zum Reaktionsverlauf mit Hilfe von Proguanil	45
3.2.1.2 Theoretische cyclische Reaktionsprodukte	47

3.2.1.3	Theoretische offenkettige Reaktionsprodukte	50
3.2.1.4	Strukturaufklärung mit Hilfe der ESI-MS	53
3.2.1.5	Ableitung des Farbproduktes von Chlorhexidin	57
4	Zusammenfassung	59
5	Experimenteller Teil	62
5.1	Allgemeine Angaben	62
5.2	Danksagungen	64
5.3	Verbindungsverzeichnis zum experimentellen Teil	65
5.4	Beschreibung der Substanzen	66
6	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	86
7	Literaturverzeichnis	88

1 Einleitung

Farbreaktionen werden durch chemische Umsetzungen von Substraten mit speziellen Reagenzien erhalten. Sie sind in der Regel einfach durchzuführen und der Materialaufwand ist gering, so daß diese häufig zur qualitativen (Reagenzglas-test, Tüpfelanalyse) und auch zur quantitativen Stoffbestimmung mittels Spektral-photometrie herangezogen werden. In den amtlichen Arzneibüchern dienen sie der Arzneistoffanalyse, indem sie bei Identitäts-, Reinheits- und auch Gehaltsbestimmungen ihre Anwendung finden.

Die erste deutsche Pharmakopöe, das Dispensatorium des Valerius Cordus, erschien in Nürnberg im Jahre 1546 und stellte noch ein Rezeptbuch dar, es enthielt fast ausschließlich „Composita“ (lat. componere = zusammensetzen).

Seit dem 18. Jahrhundert erschienen die Pharmakopöen auf Landesebene und im Jahre 1741 brachte Württemberg erstmalig eine Pharmakopöe heraus, in der auch „Simplica“ (lat. simplex = einfach) standardisiert waren. Ende des 18. Jahrhunderts wurde bereits der chemischen Analytik und den physikalischen Methoden mehr Platz in den Pharmakopöen eingeräumt und später gab es keine Pharmakopöe mehr ohne Identitäts- und Reinheitsprüfung. Grund hierfür war auch, daß im 19. Jahrhundert die Selbsterstellung durch den Apotheker immer mehr durch industrielle Herstellung von Chemikalien, chemischen Produkten, Extrakten und Tinkturen verdrängt wurde, die eine exakte Standardisierung erforderte. Im Jahre 1872 erschien in Berlin die erste deutsche Pharmakopöe, die „Pharmacopoea Germanica“. Sie bestand zu 50% aus Zubereitungen, 30% der Monographien behandelten pflanzliche und tierische Drogen und die restlichen 20% umfaßten neben 9 Alkaloiden (Aconitin, Atropin, Chinin, Cinchonin, Codein, Coniin, Morphin, Strychnin, Veratrin) sowie Coffein und Santonin hauptsächlich anorganische Chemikalien. Der Apotheker war auch damals schon verpflichtet zu prüfen, ob Identität und Reinheit den Anforderungen entsprach. So fanden schon in dieser 1. Deutschen Pharmakopöe Farbreaktionen, wie die Thalleiochin-Reaktion zum Nachweis von Chinin, die Otto-Reaktion für Strychnin, die Eisen(III)-Salz-Reaktion für Morphin und auch die Murexid-Reaktion zum Nachweis von Coffein und Santonin ihre Anwendung.^[1]

Einen ersten Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und Farbe versuchten *Graebe* und *Liebermann* im Jahre 1868 darzulegen.^[2] Acht Jahre später wurde bereits von *Witt* über die noch heute gültige Farbstofftheorie der auxochromen und chromophoren Gruppen berichtet.^[3] Der Begriff Chromophor (gr. chroma = Farbe, gr. phorein = tragen) beschreibt die Struktur in einer Verbindung, die für die Farbigkeit verantwortlich ist, hierbei handelt es sich immer um ungesättigte Gruppen.

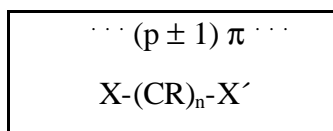
Auxochrome

(lat. auxilium = Hilfe) erweitern das chromophore System und führen damit zu einer Farbverstärkung, es sind gesättigte Gruppen.

Bei Farbreaktionen besitzen die gefärbten organischen Verbindungen ein π -Elektronensystem. Nach Dähne^[4] lassen sich für solche Systeme drei Grenzzustände formulieren:

1. der aromatische Zustand, der durch hohe Mesomerieenergien gekennzeichnet ist, mit maximalem Bindungsausgleich und identischer π -Elektronendichte an allen Atomen.
2. der Polyzustand, der eine alternierende Bindungsordnung aufweist mit identischen π -Elektronendichten an allen Atomen.
3. der Polymethinzustand, mit hoher Mesomerieenergie, maximalen Bindungsausgleich und alternierender π -Elektronendichte.

Bei Polymethinen (*Abb. I*) handelt es sich um eine beliebig substituierbare Methinkette ($= n$), die durch zwei beliebige Atome oder Atomgruppen X und X' begrenzt ist und deren π -Elektronenzahl gegenüber der Kettengliederzahl einschließlich der Kettenenden ($= p$) um ein Elektron vermehrt oder vermindert ist. Die Polymethinkette kann man sich aus einer alternierenden Über- und Unterbesetzung der Atomorbitale im (sp^2) π - Zustand entstanden denken. Diese besondere Elektronenbesetzung verursacht die Tieffarbigkeit der Polymethine^[5].



$X, X' =$ Atome der IV., V. oder VI. Hauptgruppe des Periodensystems

$(CR)_n =$ durch Atome der IV., V. oder VI. Hauptgruppe substituierbar

R = beliebige Substituenten

$$p = n+2$$

$n = p =$ ungeradzahlig : Polymethine im engeren Sinn

Abb.1 : Definition der Polymethinstruktur

Bei Polymethinen ist die Lichtabsorption bei konstanter Kettenlänge um so langwelliger, je geringer die Elektronegativität der Kettenend-Substituenten ist, je symmetrischer das π -Elektronensystem über die Kette verteilt und je größer der Bindungsausgleich zwischen Einfach- und Doppelbindungen ist. Grundsätzlich können Polymethine elektroneutrale Verbindungen, Kationen oder Anionen darstellen.

Polymethine im engeren Sinne weisen eine ungerade Zahl sp^2 -hybridisierter Kettenglieder und eine gerade Zahl von π -Elektronen auf. Polymethin-Radikale, die ebenfalls der allgemeinen Polymethin-Struktur entsprechen, aber eine gerade Zahl sp^2 -

hybridisierter Kettenglieder und demzufolge eine ungerade Zahl von π -Elektronen aufweisen, sind von den Polymethinen im engeren Sinne abzugrenzen.

Der Farbstoffcharakter der Polymethine bleibt erhalten, wenn die Methinkettenglieder durch andere Atome vergleichbarer Hybridisierung substituiert werden. Von besonderer Bedeutung sind die sogenannten Aza-polymethine, in denen eine oder mehrere $=CH$ -Gruppen durch $-N=$ ersetzt sind.

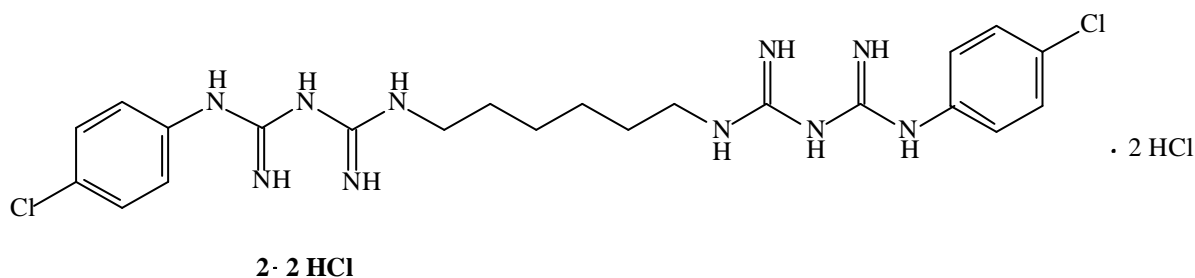
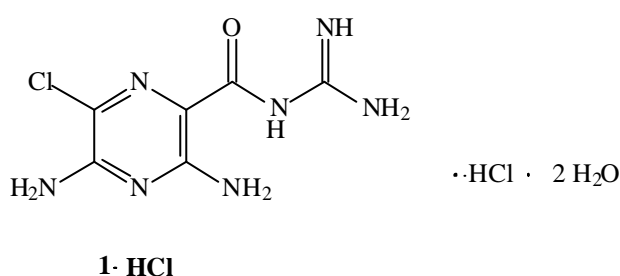
Die Nomenklatur der Polymethine richtet sich nach der Art der Endgruppen X und X' :

1. Kohlenstoff-Polymethine liegen vor, wenn die gesamte Kette einschließlich der Kettenenden aus C-Atomen besteht.
2. Mit $X = X' = N$ liegen Cyanine vor.
3. Oxonole weisen die Endgruppen $X = X' = O$ auf.
4. Mit $X = \text{Elektronenakzeptor}$ und $X' = \text{Elektronendonator}$ erhält man die Meropolymethine, deren wichtigster Vertreter mit $X = O$ und $X' = N$ als Merocyanine bezeichnet werden.

Bei gleicher Molekülgröße absorbieren Polymethine längerwellig als Aromaten und Polyene.

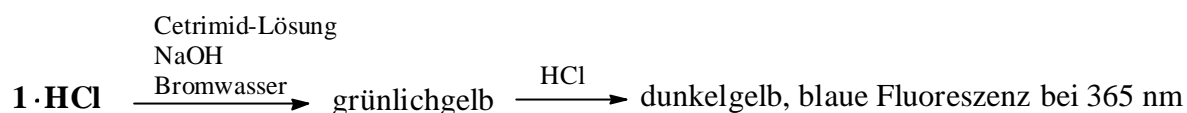
Wie eingangs erwähnt, werden Farbreaktionen in der Pharmazeutischen Chemie zur Identitätsprüfung von Arzneistoffen in den amtlichen Arzneibüchern häufig eingesetzt. Die meisten Farbprodukte gehören der Gruppe der Polymethine an.

Die Ph. Eur. 2002^[6a] läßt zur Prüfung des diuretisch wirksamen Amiloridhydrochlorids (1·HCl) und des antiseptisch wirksamen Chlorhexidindihydrochlorids^[6b] (2·2HCl) auf Identität neben physikalisch-chemischen Methoden auch jeweils eine Farbreaktion durchführen. Die Struktur der farbgebenden Produkte ist unbekannt.



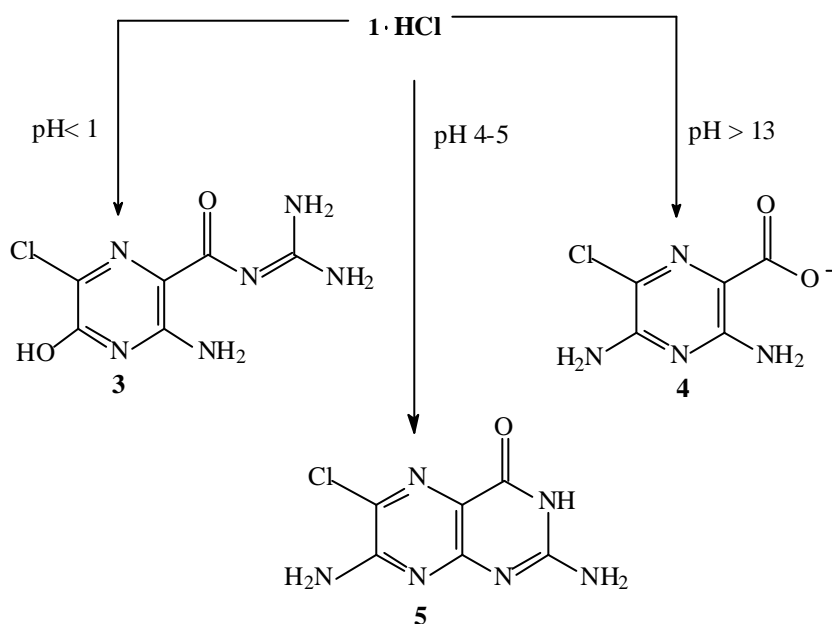
2 Problemstellung

In der Pharmacopoea Europaea 2002 wird die Identitätsreaktion für **1** folgendermaßen durchgeführt : **1·HCl** wird mit Cetrimid (Cetyltrimethylammoniumchlorid) - Lösung , Natronlauge und Bromwasser bei Raumtemperatur umgesetzt. Es entsteht eine grünlichgelb gefärbte Lösung, die auf Zusatz von Salzsäure nach Dunkelgelb umschlägt. Bei einer Wellenlänge von 365 nm zeigt die Lösung eine blaue Fluoreszenz.



Weder in der Monographie von Mazzo in Florey^[8] noch im Kommentar zum Europäischen Arzneibuch finden sich Hinweise auf die chemischen Vorgänge bei dieser Identitätsprüfung. Zunächst sollte deshalb die Struktur des für die Farbreaktion verantwortlichen Produkts ermittelt werden.

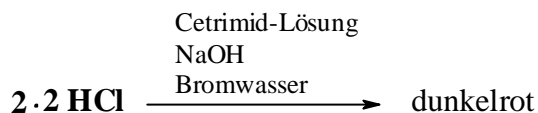
Der Kommentar des Arzneibuches zitiert aus Florey^[8] Angaben über die Stabilität von **1·HCl**. Danach sind wässrige Lösungen bei Raumtemperatur stabil. Man erhält jedoch bei erhöhten Temperaturen und verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Zersetzungsprodukte (*Schema 1*).



Schema 1: pH-abhängige Zersetzungsprodukte von 1·HCl

Die Hydroxypyrazinverbindung **3**^[9] und die Pyrazincarbonsäure **4**^[10] sind bereits in der Literatur beschrieben, werden jedoch auf anderem Wege synthetisiert, wohingegen das Cyclisierungsprodukt **5** literaturunbekannt ist. Ziel sollte es sein, diese Verbindungen ausgehend von **1·HCl** darzustellen.

Zur Identitätsprüfung von **2 · 2 HCl** wird nach der Ph. Eur. 2002 die Substanz in einer warmen Lösung von Cetrimid gelöst. Es werden ebenfalls Natronlauge und Bromwasser hinzugegeben und es entsteht eine dunkelrote Färbung.



Laut Kommentar des Arzneibuches ist auch hier der Reaktionsmechanismus unbekannt, so daß versucht werden sollte, diesen aufzuklären.

3 Theoretischer Teil

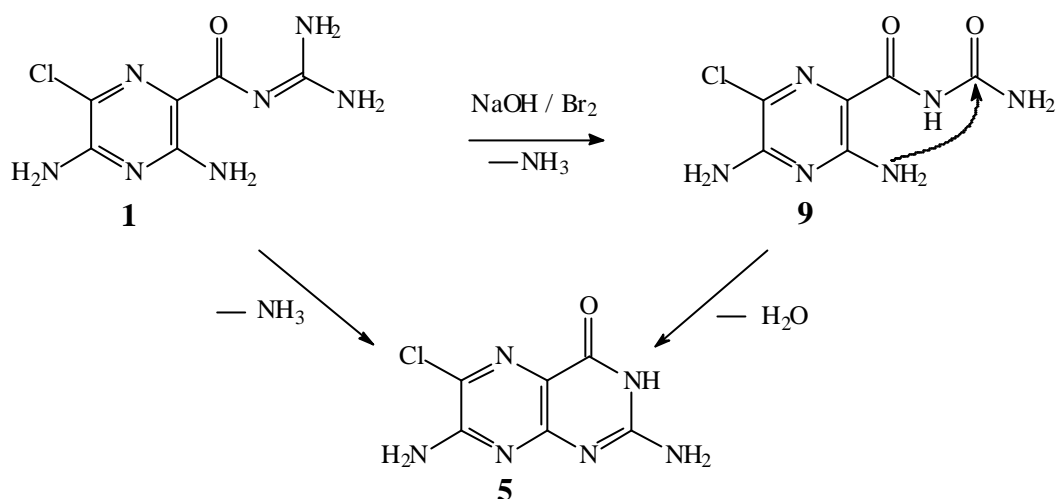
3.1 Amiloridhydrochlorid

3.1.1 Identitätsreaktion Amiloridhydrochlorid

In der Ph. Eur. 2002 werden nach der Identitätsreaktion C ^[6a] 10 mg Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) in 10 ml Wasser gelöst. Nachdem 10 ml einer 20prozentigen Lösung von Cetrimid *R*, 0,25 ml verdünnter Natriumhydroxid-Lösung *R* und 1 ml Bromwasser *R* hinzugefügt werden, entsteht eine grüngelbe Färbung. Nach Zusatz von 2 ml verdünnter Salzsäure *R* schlägt die Farbe nach Dunkelgelb um, wobei die Lösung eine blaue Fluoreszenz im ultravioletten Licht bei 365 nm zeigt.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit soll zunächst die Identifizierung des fluoreszierenden Produktes sein.

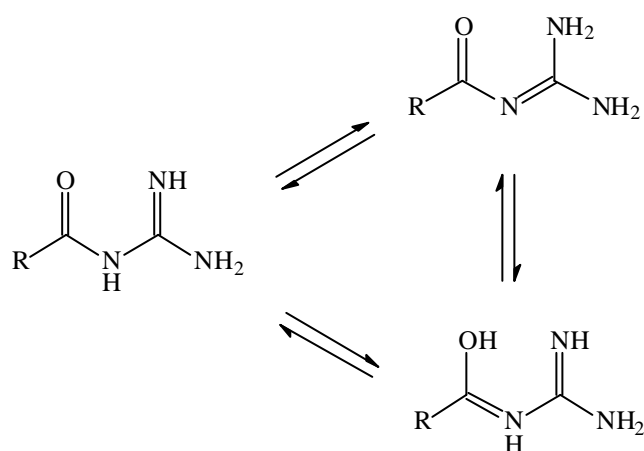
Im Arzneibuchkommentar^[7] wird nach Florey^[8] gezeigt, daß ausgehend von **1·HCl** bei erhöhten Temperaturen und einem pH-Wert 4-5 die Verbindung **5** entstehen soll (*Schema 1*). Diese weist die Grundvoraussetzungen für eine Fluoreszenz auf: sie ist planar, besitzt ein konjugiertes π -Elektronensystem und verfügt über Elektronendonator-Gruppen. Somit wurde die Vermutung angestellt, daß **5** das farbgebende, fluoreszierende Produkt der Identitätsreaktion darstellt. Durch Hydrolyse der Guanidingruppe zum Harnstoff **9** kann die Carbonylgruppe nucleophil von der Aminogruppe in Position drei angegriffen werden, unter H₂O-Abspaltung gelangt man zum 2,7-Diamino-6-chlor-4(3*H*)-pteridinon (**5**) (*Schema 2*). Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Aminogruppe der Position drei direkt die Guanidingruppe nucleophil angreift und man unter Abspaltung von Ammoniak das Produkt **5** erhalten würde (*Schema 2*).



Schema 2: Möglicher Reaktionsmechanismus zur Bildung von **5**

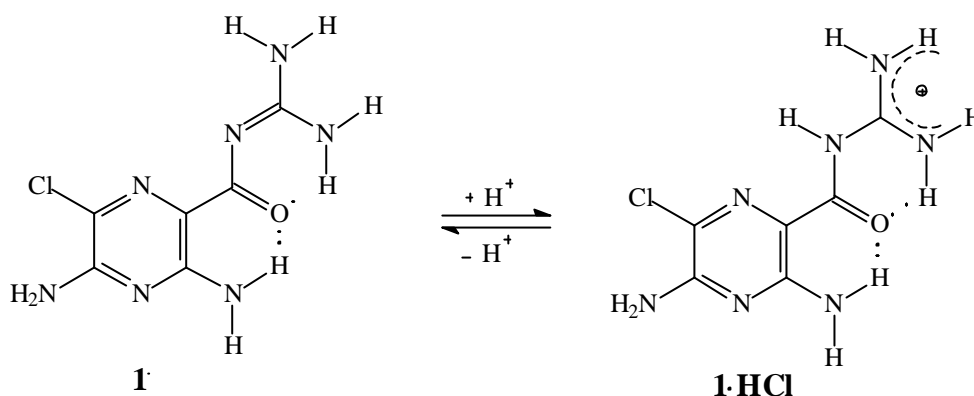
Zunächst wurde die Reaktionslösung mit Hilfe der DC untersucht. Verfahren wurde nach der Vorschrift der Ph. Eur., jedoch unter Verzicht des für die Farbreaktion nicht notwendigen Zusatzes von Cetrimid. Im Fließmittelgemisch Dioxan/ H₂O/ NH₃ 10% (88:6:6) (FM 1) wurde bei der Detektion unter UV-Licht bei 365 nm ein blau fluoreszierendes Produkt mit einem R_F-Wert von 0,8 sichtbar und bei einem R_F-Wert von 0,5 das Edukt, welches ebenfalls eine blaue Fluoreszenz aufweist.

Smith und Mitarbeiter^[11] haben mit Hilfe von ¹H-, ¹³C-, ¹⁵N-NMR Experimenten und CNDO/2 - Berechnungen die Lage der Doppelbindung in der Acylguanidin-Seitenkette für **1** und **1·HCl** beschrieben. Sie kann in 3 tautomeren Formen vorliegen (Schema 3).



Schema 3: Tautomere des Acylguanidins

Die freie Base bevorzugt die Acyliminostruktur, während im Hydrochlorid die Acylaminostruktur vorliegt. Diese Struktur von Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) wurde durch Röntgenstrukturanalyse bewiesen^[11]. Somit können sich über H-Brücken planare Systeme aus 3 Ringen bilden (Schema 4), welche für die Fluoreszenz von **1** und **1·HCl** verantwortlich sein dürften.



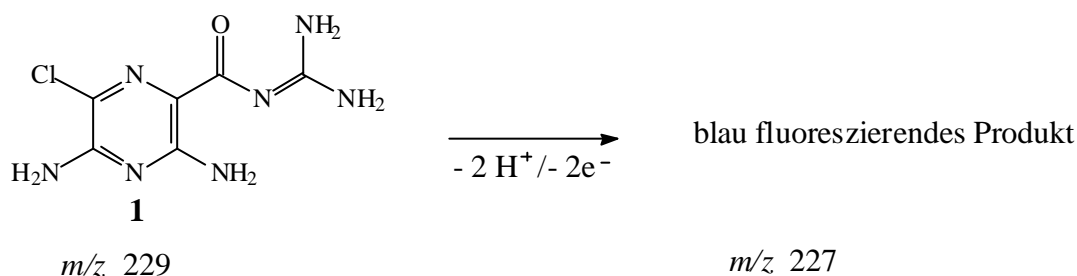
Schema 4

Zum Extrahieren des fluoreszierenden Produktes erwies sich *t*-Butylmethylether als das geeignetste Lösungsmittel. Um **1** nicht mit zu erfassen, wurde im sauren Milieu bei pH 3.2 gearbeitet. Die Ausbeute lag jedoch nur bei 1% und konnte durch Verlängerung der Reaktionszeit oder Arbeiten bei erhöhten Temperaturen nicht gesteigert werden. Ebenso

wenig gelangte man durch Vergrößerung der Reaktionsansätze zu verbesserten Ausbeuten, wobei die Möglichkeiten aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von **1·HCl** (5.2 mg / ml) und vor allem der Base (**1**) (0.3 mg / ml) eingeschränkt waren. Ein kontinuierliches „Ausschütteln“ mit Hilfe eines Perforators lieferte noch geringere Ausbeuten und zusätzliche Nebenprodukte. Somit mußten mehrere kleine Ansätze gesammelt werden, um ausreichend Produkt für analytische Untersuchungen zu erhalten. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Waschen des Rückstandes mit Chloroform erhielt man einen braunen Feststoff. Zum Umkristallisieren des fluoreszierenden Produktes boten sich aufgrund der schweren Löslichkeit nur DMSO bzw. DMF an, wobei es nur gelang, die Substanz aus DMF / Wasser in kleinen bräunlichen Nadeln auskristallisieren zu lassen.

3.1.2 Strukturaufklärung der fluoreszierenden Substanz

Die Auswertung der spektroskopischen Daten zeigt im ^{13}C -NMR sechs quartäre C-Atome, wie man sie für das Produkt **5** erwartet. Im ^1H -NMR sind zwei Singulets zu sehen, die nach D_2O Zugabe gelöscht werden. Auch diese Signale sind für **5** vorstellbar, geht man von magnetischer Äquivalenz der Aminogruppen aus. Betrachtet man jedoch das Verhältnis der Signale zueinander, findet man nicht wie erwartet ein Verhältnis von 1 : 4 sondern eines von 1 : 2, was gegen die Verbindung **5** spricht. Das Massenspektrum zeigt nicht den erwarteten Molpeak für das Pteridinon, sondern eine um zwei m/z geringere Masse gegenüber der Ausgangsverbindung **1**. Auf Grund des Isotopenmusters muß die unbekannte fluoreszierende Verbindung weiterhin ein Chloratom enthalten. Aus dem Massenspektrum und der Elementaranalyse ergibt sich die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}_7\text{O}$, die Verbindung ist demnach ein Dehydrierungsprodukt von **1** (Schema 5).

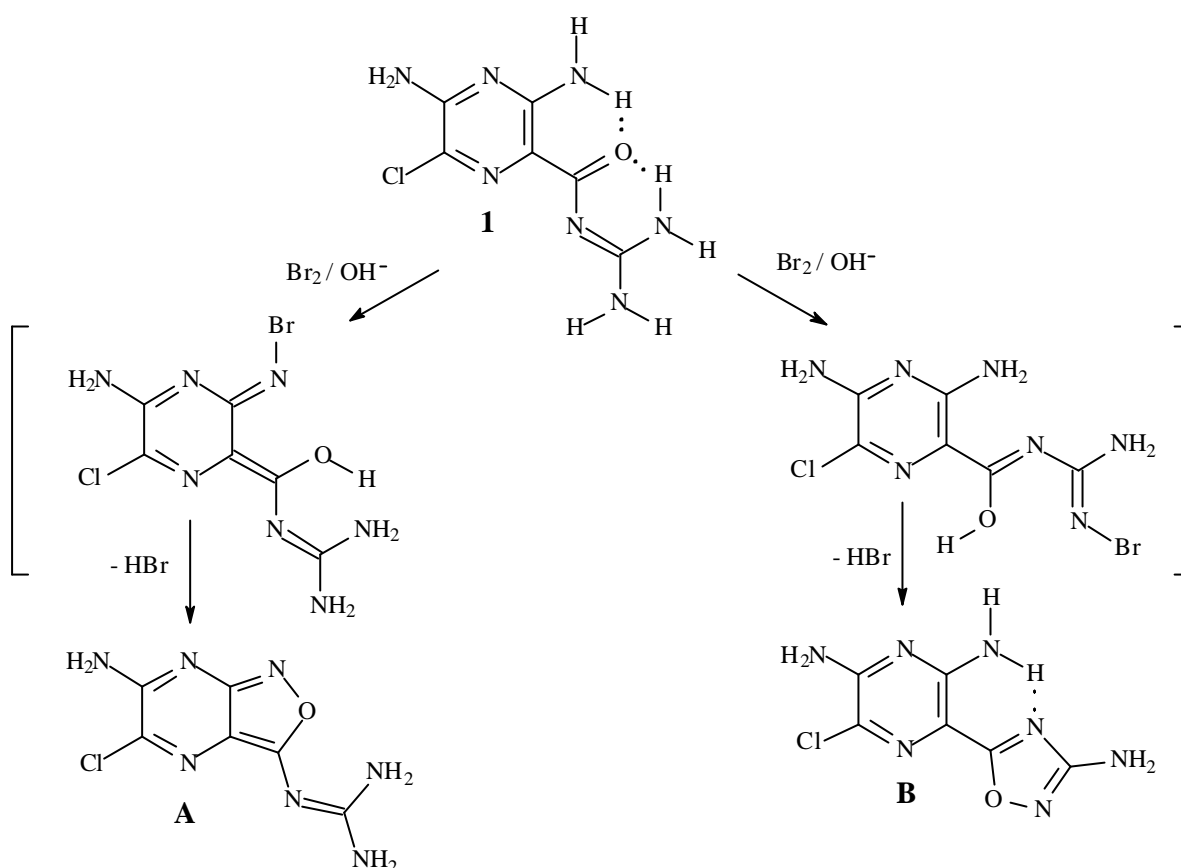


Schema 5

3.1.2.1 Theoretische Reaktionsprodukte

Amilorid (**1**) reagiert mit Brom und Natronlauge unter Dehydrierung zum unbekannten Farbprodukt. Aus den vorliegenden Daten (^1H -, ^{13}C -NMR, Summenformel) und dem Wissen, daß die Substanz fluoresziert, bieten sich für die Farbreaktion verschiedene theoretische Produkte an, die im Folgenden vorgestellt werden.

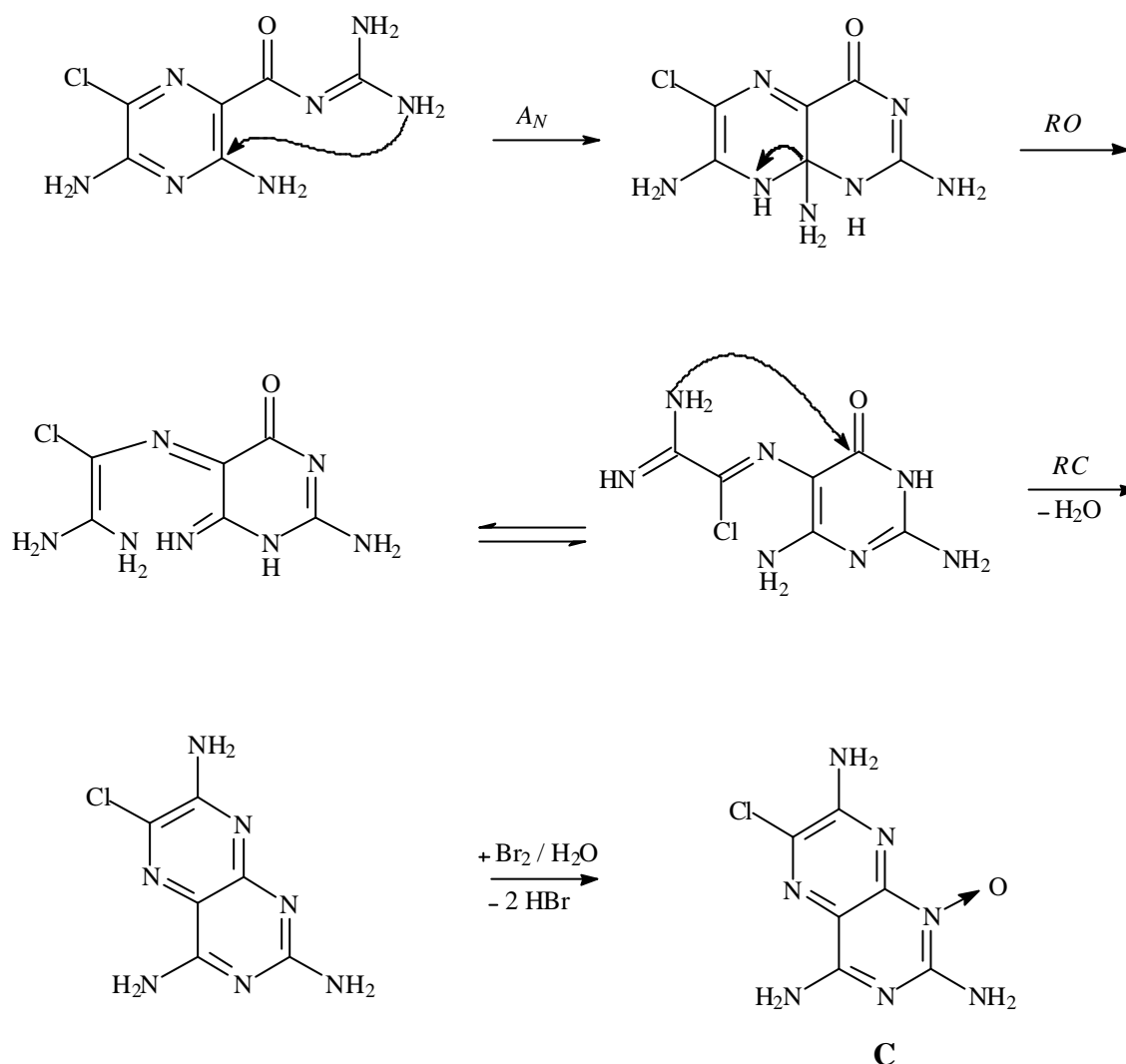
Die Dehydrierung könnte intermediär über eine *N*-Bromverbindung verlaufen, wobei die elektrophile Substitution am Stickstoff in Position 3 des Pyrazinringes als auch an der Guanidingruppe erfolgen kann. Nach anschließender Eliminierung von HBr kann Cyclisierung zum Isoxazolopyrazinylguanidin **A** oder Oxadiazolypyrazin **B** eintreten (Schema 6).



Schema 6: Dehydrierung über N-Bromverbindungen

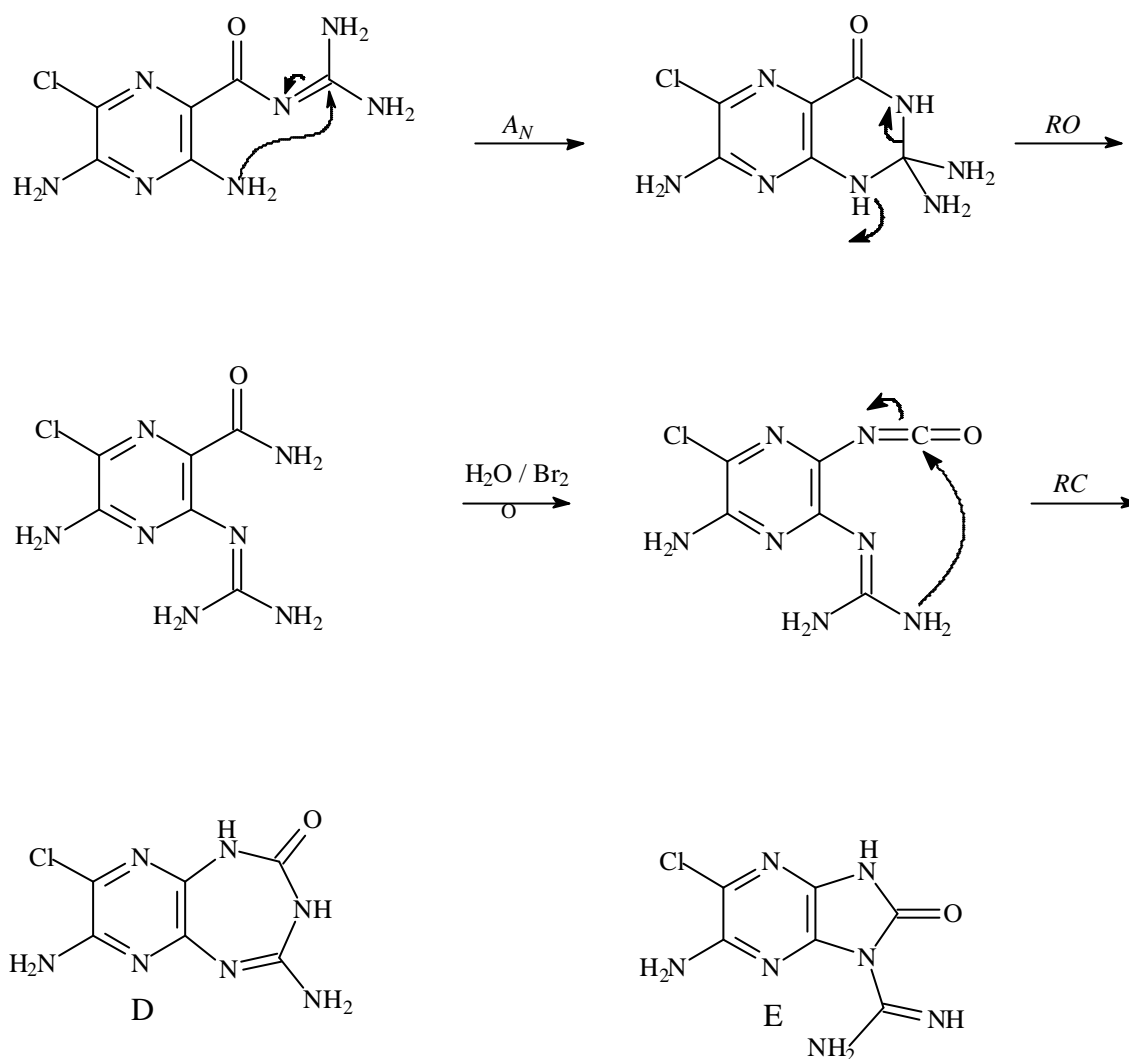
Es sind weitere Produkte zu diskutieren, die über den *ANRORC*-Mechanismus entstehen können. Unter dem Begriff verbirgt sich Addition of a Nucleophile, Ring Opening und Ring Closure nach H.C. van der Plas^[12].

Für die Farbreaktion des Amilorids kann die nucleophile Addition am Pyrazinring in Position 3 durch eine Aminogruppe der Guanidinseitenkette erfolgen (Schema 7), so daß man 2,7,8a-Triamino-6-chlor-8,8a-dihydro-4(1*H*)-pteridinon erhält. Es erfolgt Ringöffnung zum (5*E*)-2-amino-5-[(*E*)-2,2-diamino-1-chlorethenyl]imino}-6-imino-5,6-dihydro-4(1*H*)-pyrimidinon. In der dargestellten tautomeren Form kann die Carbonylgruppe des Pyrimidinons nukleophil angegriffen werden und unter Wasserabspaltung tritt Ringschluß zum 6-Chlor-2,4,7-pteridintriamin ein. Im letzten Schritt erfolgt durch Bromwasser Oxidation zum *N*-Oxid **C** (Schema 7).



Schema 7: ANRORC I

Im umgekehrten Falle kann die Guanidingruppe durch die Aminogruppe in Position 3 nucleophil angegriffen werden (Schema 8). Man erhält zunächst 2,2,7-Triamino-6-chlor-2,3-dihydro-4(1*H*)-pteridinon und nach Ringöffnung entsteht 5-Amino-6-chlor-3-[(diaminomethylen)amino]-2-pyrazincarboxamid. Es erfolgt im nächsten Schritt, ähnlich dem Hofmann-Abbau^[13], eine Umlagerung zum *N*''-(6-Amino-5-chlor-3-isocyanat-2-pyrazinyl)-guanidin. Nun kann je nach Lage der Doppelbindung im Guanidin, der Ring zum 4,8-diamino-7-chlor-1,3-dihydro-2*H*-pyrazino[2,3-*f*][1,3,5]triazepin-2-on (**D**) oder 5-Amino-6-chlor-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyrazin-1-carboxamid (**E**) geschlossen werden.



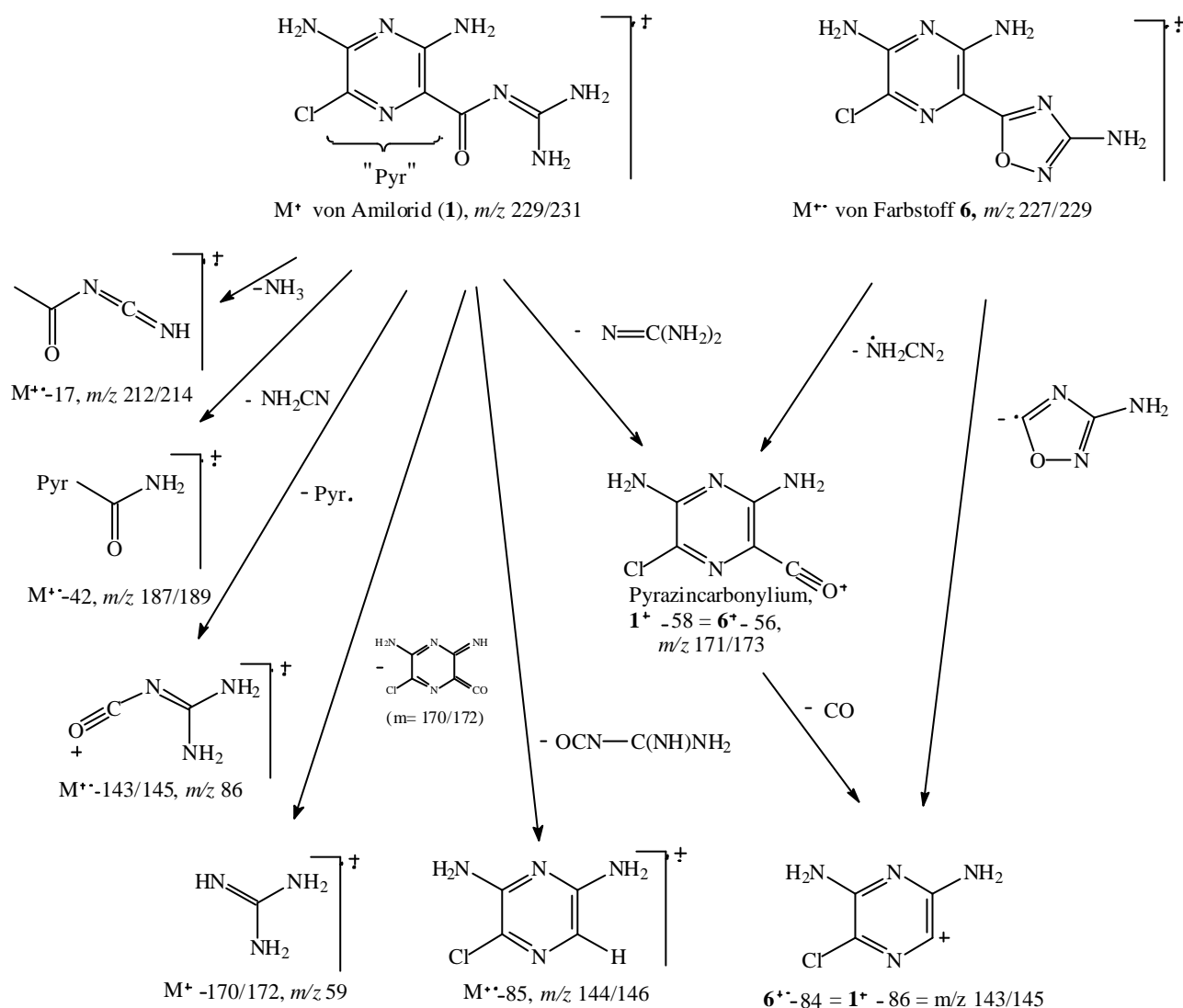
Schema 8: ANRORC II

3.1.2.2 Ableitung der Struktur durch Vergleich von Massenspektren

Wichtige Hinweise auf die tatsächliche Struktur des Farbproduktes ergeben sich aus dem Vergleich des Massenspektrums mit jenem von Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) (*Schema 9*).

Für **1·HCl** erhält man im MS (EI) als Molpeak m/z 229/231 für die Base. Außerdem findet man charakteristische Peaks der Masse $M^+ - 17$, $M^+ - 42$, $M^+ - 85$ (Pyrazin-Kationen, m/z 144/146), $M^+ - 58$ (Pyrazincarbonylium, m/z 171/173), und $M^+ - 86$ (Pyrazinyl-Kationen, m/z 143/145). Die Fragmente entstehen durch Eliminierung von Ammoniak, Cyanamid, Amidinoisocyanat und das Pyrazincarbonylkation entsteht durch Eliminierung eines Diaminomethylenaminoylradikals. Sie dokumentieren den schrittweisen Abbau der Guanidincarbonyl-Seitenkette. Komplementär findet man auch intensitätsstarke Peaks für Cyanamid (m/z 43, nicht im Schema), Guanidin- und Guanidincarbonyl-Kationen (59 und 86). Aus dem Moleküllion des Farbstoffs (m/z 227/229) hingegen entstehen nur zwei wichtige Fragmentationen, nämlich das Pyrazincarbonyl- ($M^+ - 56$, m/z 171/173) und das Pyrazinyl-Kation ($M^+ - 84$, m/z 143/145), die auch im MS von Amilorid gefunden werden. Hier wird nun deutlich, daß die Diaminochlorpyrazinteilstruktur bei der Fragmentierung sowohl des Farbstoffs als auch von **1·HCl** unberührt bleibt. Folglich muß das Produkt aus Amilorid (**1**) durch Dehydrierung der Guanidincarbonylteilstruktur ohne Beteiligung des Diaminochlorpyrazinringes entstanden sein. Eine Dehydrierung in dieser Seitenkette ist nur unter gleichzeitigem Ringschluß möglich. Betrachtet man die möglichen Reaktionsprodukte **A-E**, so wird deutlich, daß als Farbprodukt sehr wahrscheinlich das 3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamin (**6=B**) vorliegt (*Schema 9*).

Das Vorhandensein des kompakten aromatischen Aminoxadiazolylrestes in **6** an Stelle des leicht fragmentierbaren Guanidincarbonylrestes in **1** erklärt auch sehr gut die im Vergleich zu **1** höhere Stabilität des Farbprodukts **6** im MS.



Schema 9: Fragmentierungsreaktionen von Amilorid (**1**) und Farbstoff (**6**)

3.1.2.3 Ableitung der Struktur des Farbstoffes durch Vergleich von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Referenzsubstanzen

Auch beim Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten mit ausgewählten Referenzsubstanzen wird deutlich, daß die Diaminochlorpyrazin-Teilstruktur im Farbprodukt erhalten bleiben muß. Im ^1H -NMR findet man zwei Signale für Aminprotonen mit den Intensitäten 2:4 bei $\delta = 6.26$ und 7.28 . Die chemische Verschiebung der Protonen zweier magnetisch äquivalenter Aminogruppen bei 7.28 ist typisch für 3/5-Aminopyrazin-2-carbonsäure-Derivate wie z.B. 3,5-Diamino-5-chlorpyrazin-2-(N-cyanocarboxamidin)^[14] ($\delta = 7.47$) (**1**, Abb. 3). Die Protonen der dritten Aminogruppe treten bei $\delta = 6.26$ in Resonanz, einem Bereich der bei

Oxadiazolaminen, z.B. 5-Phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-amin (**III**) ^[15] $\delta = 6.40$ beobachtet wird. Auch der Vergleich der ¹³C-Spektren von Amilorid (**1**) und Produkt **6** bestätigt die Befunde, denn die Spektren unterscheiden sich lediglich bei den chemischen Verschiebungen der C-Atome in der Guanidincarbonyl- bzw. Oxadiazol-Teilstruktur sowie beim C-2 von **1** bzw. dem korrespondierenden C-3 des Farbstoffes. Die chemischen Verschiebungen der Pyrazinkohlenstoffe C-2,6 ($\delta = 153.19/152.71$) und C-5 ($\delta = 120.01$) von Farbstoff **6** stimmen weitgehend mit denen der Signale für die korrespondierenden C-3,5 und C-6 bei **1** (154.92/151.34; 118.96) bzw. dem Aminopyrazincarbonsäureester **II** ($\delta = 154.38/153.79$; 121.63^[16]) überein (Abb. 2).

Diese Befunde zeigen, ebenso wie die MS-Vergleiche, daß die Reaktion von **1** mit Brom nur unter Dehydrierung des Guanidincarbonylrestes erfolgt sein kann und der Farbstoff als (Aminooxadiazolyl)chlorpyrazindiamin **6** vorliegen muß.

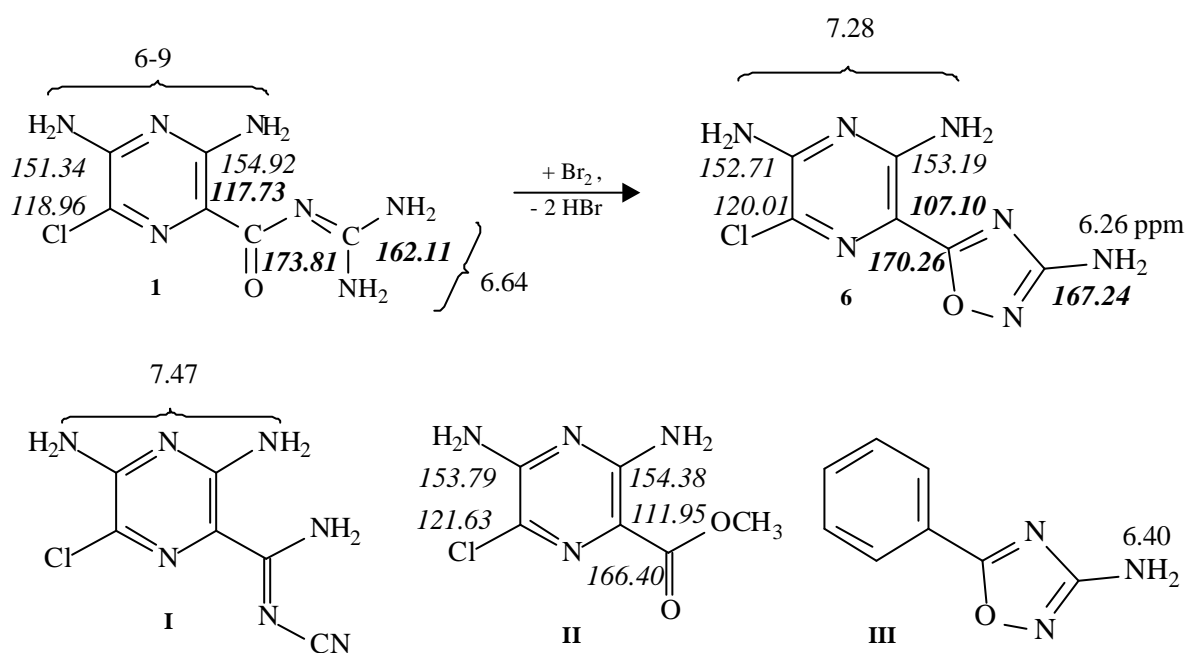


Abb. 2 : ¹H- und ¹³C- (kursiv) – Verschiebungen von Amilorid **1**, Farbstoff **6** und Vergleichssubstanzen **I-III**

3.1.2.4 Röntgenstrukturanalyse

Zur Sicherung der Struktur wurden Einkristalle gezüchtet (DMF/ H₂O) und eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Sie beweist, daß eine Dehydrierung des Acylguanidins von **1** zum 3-Amino-1,2,4-oxadiazol **6** erfolgt war (Abb. 3). Wie die Torsionswinkel zeigen, liegen der Pyrazin- und der Oxadiazol-Ring praktisch in einer Ebene. Die nahezu planare Fixierung durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 2 -Aminogruppe des Pyrazins und dem N-4 des 1,2,4-Oxadiazols dürfte für die Fluoreszenz des Farbprodukts in Lösung verantwortlich sein.

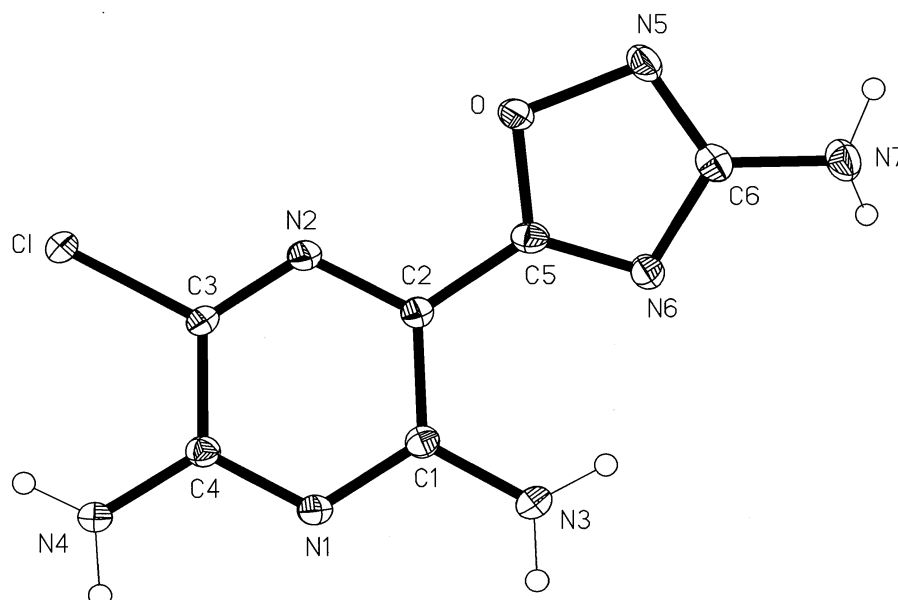
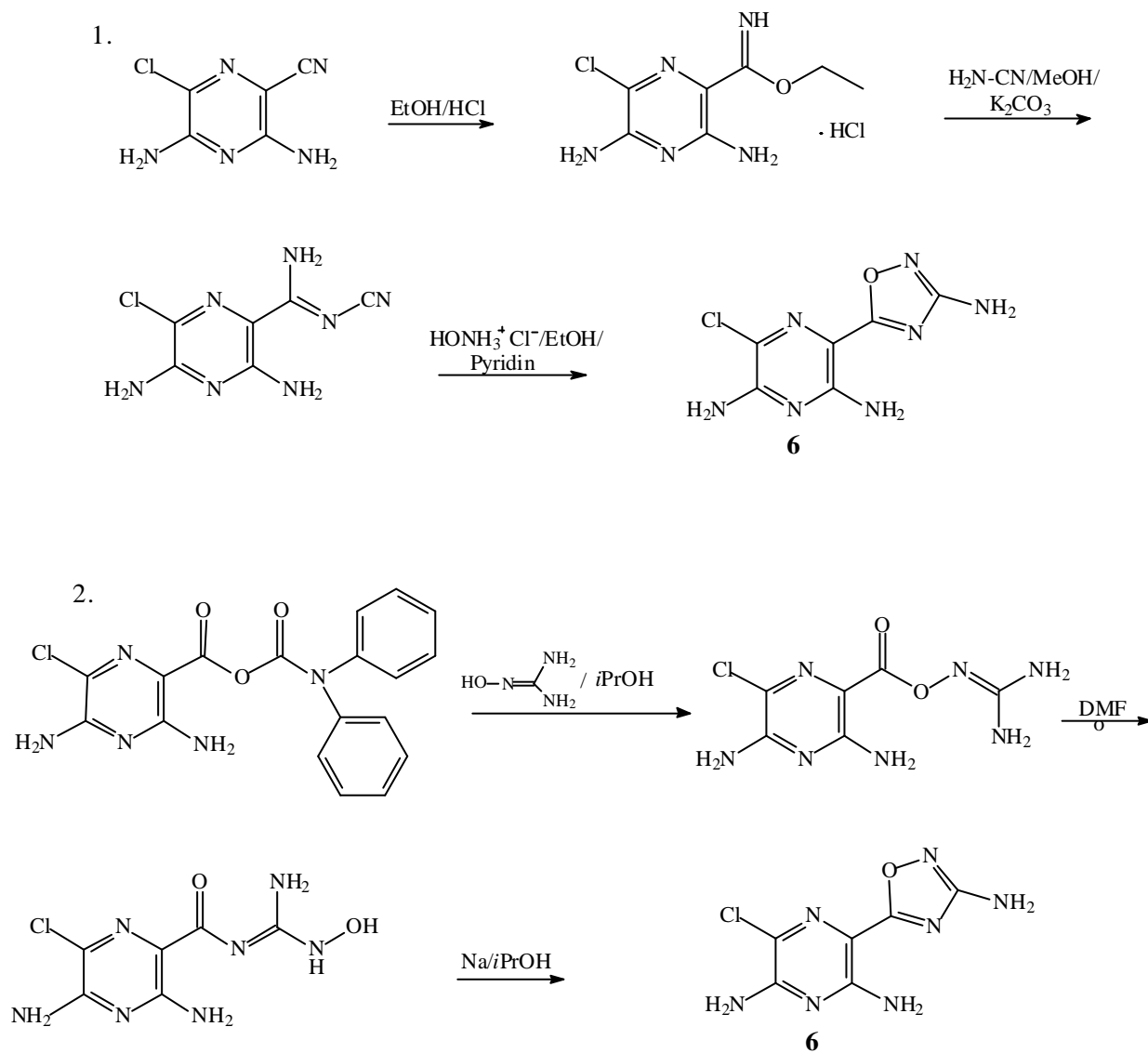


Abb. 3: Röntgenstruktur von **6**

Farbstoff **6** ist bekannt und wird in der Literatur auf zwei alternativen Wegen synthetisiert^[14,17], so z.B. von Watthey et al.^[14] durch Addition von Hydroxylamin an das 3,5 Diamino-6-chlor-*N'*-cyano-2-pyrazincarboximidamid (1., *Schema 10*) und Ringschluß zu **6** oder nach Bock et al.^[17] über *N'*-[(*E*)-(3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)oxo)methyl]-*N*-hydroxyguanidin (2., *Schema 10*) und anschließendem Ringschluß. Der Vergleich der ¹H- und ¹³C-Verschiebungen im NMR sowie der IR-Banden des isolierten Farbstoffs mit den Daten des von Bock et al.^[16] hergestellten Oxadiazolpyrazindiamins zeigte eine gute

Übereinstimmung . In Tiermodellen wurde *in vivo* gezeigt, daß **6** als Prodrug von Amilorid (**1**) anzusehen ist, durch reduktive Ringöffnung wird **1** gebildet^[17].



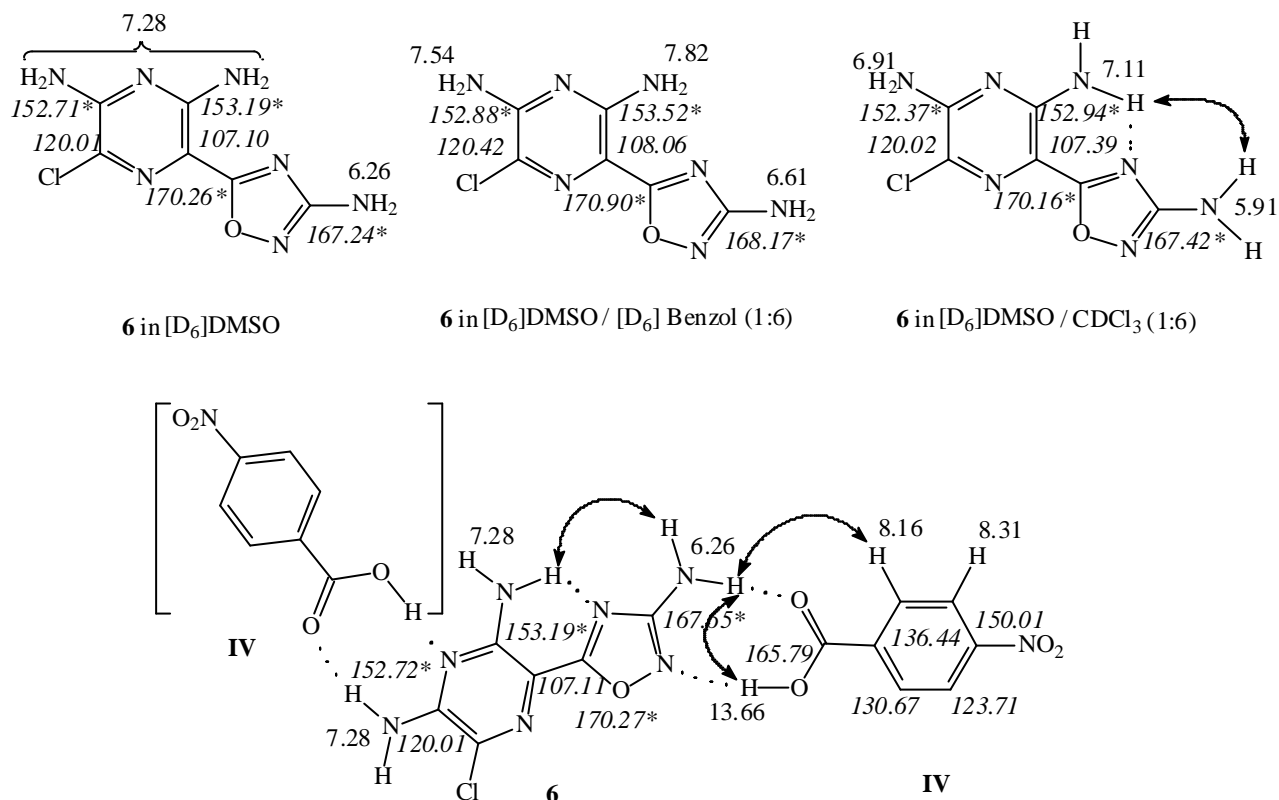
Schema 10: Literaturbekannte Synthesen der Verbindung **6**

3.1.2.5 2D-NMR-Untersuchungen vom Farbstoff

Wie unter 3.1.2.3 gezeigt, erlaubten Vergleiche der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren des isolierten Produkts **6** mit Spektren von Amilorid (**1**) und Referenzsubstanzen **I-III** (Abb. 2) die Ableitung der Struktur des Amino-oxadiazolpyrazindiamins **6**. Es stellt sich nun allerdings die Frage der korrekten Zuordnung der jeweils paarweise nahe beieinander liegenden ^{13}C -NMR Signale bei $\delta = 153.19/152.71$ zu C-2 bzw. C-6 im Pyrazin- und bei $\delta = 167.24/170.26$ zu C-3' bzw. C-5' im Oxadiazolring. Vergleiche mit Amilorid (**1**), dessen ^{13}C -Signale Smith et al. ^[11] auf Grund sorgfältiger Studien mit modifizierten Modellschubstanzen des Typs **1** (H, Br, J anstelle des Cl; Dimethylamino anstelle von NH_2 , etc.), jedoch ohne Absicherung durch Korrelationsspektren zugeordnet hatten, und mit 6-Chlor-3,5-diaminopyrazin-2-carbonsäuremethylester (**II**)^[16] (siehe Abb. 2) sprachen für die Zuordnung der ^{13}C -Signale von **6** bei $\delta = 107.10$ und 120.01 zu C-3 und C-5. Sie erlaubten jedoch nicht die sichere Zuordnung der anderen Signalaare.

Somit wurde versucht, die Zuordnung der ^{13}C -Signale von **6** über die Messung von CH-Korrelationen zwischen den Aminprotonen in 2,6-Stellung des Pyrazinringes bzw. in 3-Stellung des Oxadiazolringes und Kohlenstoffatomen der beiden Ringe über zwei, drei und vier Bindungen durchzuführen.

Die zunächst in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ durchgeführten ^1H , ^{13}C -COLOC (bzw. HMBC) - Experimente zeigten nur Korrelationen zwischen den Aminprotonen bei $\delta = 7.28$ und den Kohlenstoffatomen des Pyrazinringes bei $\delta = 107.10$ und 152.71 . Um eine Nichtäquivalenz der Aminogruppen am Pyrazin herbeizuführen und somit zusätzliche CH-Korrelationen zu finden, wurden auch Messungen in Lösungsmittelgemischen (ein kleiner Anteil an $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ war wegen der schlechten Löslichkeit von **6** immer notwendig) und in Gegenwart von Säuren durchgeführt (Schema 11). Die Verwendung von $[\text{D}_6]\text{DMSO}/[\text{D}_6]\text{Benzol}$ (1:6) als Lösungsmittel führte bei den Aminprotonen zu Tieffeldverschiebungen, so daß für die Aminprotonen im Pyrazin zwei getrennte Resonanzen bei $\delta = 7.82$ und 7.54 auftraten. Es waren allerdings keine erfolgreichen 2D-Messungen möglich, denn die Signale waren stark verbreitert. Die Anwendung von $[\text{D}_6]\text{DMSO}/\text{CDCl}_3$ (1:6) hingegen führte bei den genannten Protonen zu einer Hochfeldverschiebung bei nur mäßiger Verbreiterung. Wechselseitige NOEs zwischen den Oxadiazolamin-Protonen bei $\delta = 5.91$ und den Aminprotonen bei $\delta = 7.11$ ermöglichten die Zuordnung des letztgenannten Signals zu den NH_2 -Protonen in Position 2 des Pyrazindiamins. Leider waren auch hier keine CH-Korrelationen zu beobachten.



Assoziat aus **6** und **IV** (1:1) und [1:2], Werte des (1:1)-Komplexes in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$

Schema 11: ^1H - und ^{13}C (kursiv)-Verschiebungen sowie NOEs von **6** in verschiedenen

Lösungsmitteln und von Assoziaten aus **6** und **IV** (*= Zuordnung nicht gesichert)

In drei weiteren Experimenten wurde geprüft, welche Auswirkungen auf Lage und Form der NH₂-Signale die Zugabe von Säuren hat, die Wasserstoffbrücken bilden.

Es wurden ^1H -, ^{13}C -NMR und CH-Korrelationsspektren einer (1:1) - und (1:2) – Mischung aus **6** und p-Nitrobenzoesäure (**IV**) in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ aufgenommen (Schema 11). Sie waren identisch mit denen, die durch Überlagerung der Einzelspektren beider Verbindungen erhalten wurden. **6** bildet also mit **IV** kein Salz. Wechselseitige NOEs zwischen den Oxadiazolamin-Protonen bei $\delta = 6.26$ und den sauren Protonen der Nitrobenzoesäure bei $\delta = 13.66$ deuten im (1:1)–Gemisch auf die Bildung von Assoziaten aus **6** und **IV** hin, die über Wasserstoffbrücken verbunden sein dürften (Schema 11). Übereinstimmend damit führt die Einstrahlung auf das Signal bei $\delta = 6.26$ zur Anregung der o-Protonen von **IV** bei $\delta = 8.16$ und, wie bei Base **6**, der Aminprotonen in 2-Stellung des Pyrazins bei $\delta = 7.28$. Man findet ebenfalls die CH-Korrelationen zwischen den Pyrazinamin-

Protonen und C-3 ($\delta = 107.11$) sowie C-2 bzw. C-6 ($\delta = 152.72$). Es zeigt sich eine schwache Korrelation zwischen den Oxadiazolaminprotonen bei $\delta = 6.26$ und dem C-Signal bei $\delta = 170.27$, so daß dieses Signal C-3' oder C-5' im Oxadiazolring zuzuordnen ist.

Für die erwartete Bildung eines (1:2)-Komplexes mit zusätzlichen Wasserstoffbrücken zwischen einer der beiden Pyrazinamin-Teilstrukturen von **6** und der Carboxylgruppe eines zweiten Moleküls von **IV** wurden keine Hinweise gefunden.

Auch bei äquimolarer Zugabe von Trifluoressigsäure zur (1:1)-Mischung von **6** und **IV** in $[D_6]DMSO$ bildete sich kein Salz. Die Signale für **6** und **IV** erschienen unverändert im ^{13}C -NMR. Im 1H -Spektrum bleibt die chemische Verschiebung der *o*- und *m*-Protonen von **IV** ebenfalls unverändert, doch erscheinen die Aminprotonen als sehr breite Signale im Bereich von $\delta = 6.8$ - 8.0 und $\delta = 9.8$ - 12.8 .

3.1.3 Derivatisierungsversuche

Die Struktur der Verbindung **6** wurde zunächst mit Hilfe von MS, 1H - und ^{13}C -Daten abgesichert (3.1.2.2 und 3.1.2.3), dann wurde der Strukturbeweis über eine Röntgenstrukturanalyse erbracht (3.1.2.4). Von der Substanz **6** Einkristalle zu züchten, erwies sich auf Grund der schlechten Löslichkeit als schwierig, deshalb wurde parallel dazu versucht, über geeignete Derivatisierungen die Löslichkeit der Substanz zu verbessern. Die Reaktionen sollten zunächst mit einer Modellschubstanz durchgeführt werden, da **6** nur in sehr geringen Ausbeuten isoliert werden konnte. Gewählt wurde das kaliumsparende Diuretikum Triamteren **7** (Abb. 4), da es eine dem Farbprodukt ähnliche Struktur und Löslichkeit aufweist.

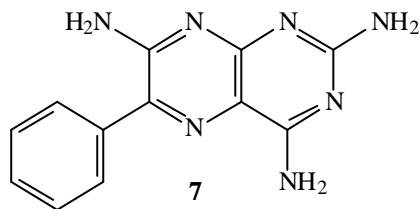


Abb. 4: Modellschubstanz Triamteren

Zunächst wurde versucht, die Aminogruppen im Pteridin **7** zu acetylieren (*Schema 12*). In der Literatur wird beschrieben, daß man *N*-[2,4-bis(acetylamino)-6-phenyl-7-pteridiny]acetamid (**F**) erhält, indem in Acetanhydrid unter Rückfluß erhitzt wird^[18].

Es wurden neben dieser Literaturvorschrift weitere Acetylierungsversuche durchgeführt. So z.B. mit Pyridin als Hilfsbase, bei Raumtemperatur und mit Acetylchlorid als Acetylierungsreagenz. Die Untersuchung der Reaktionsansätze mit Hilfe der DC (FM 2) lieferte 3-4 Produkte, wahrscheinlich auf Grund unterschiedlicher Acetylierungsgrade. Es ist nicht gelungen, durch Umkristallisation oder FC die Produkte zu trennen, da es sich auch hier um sehr schwer lösliche Verbindungen handelte.

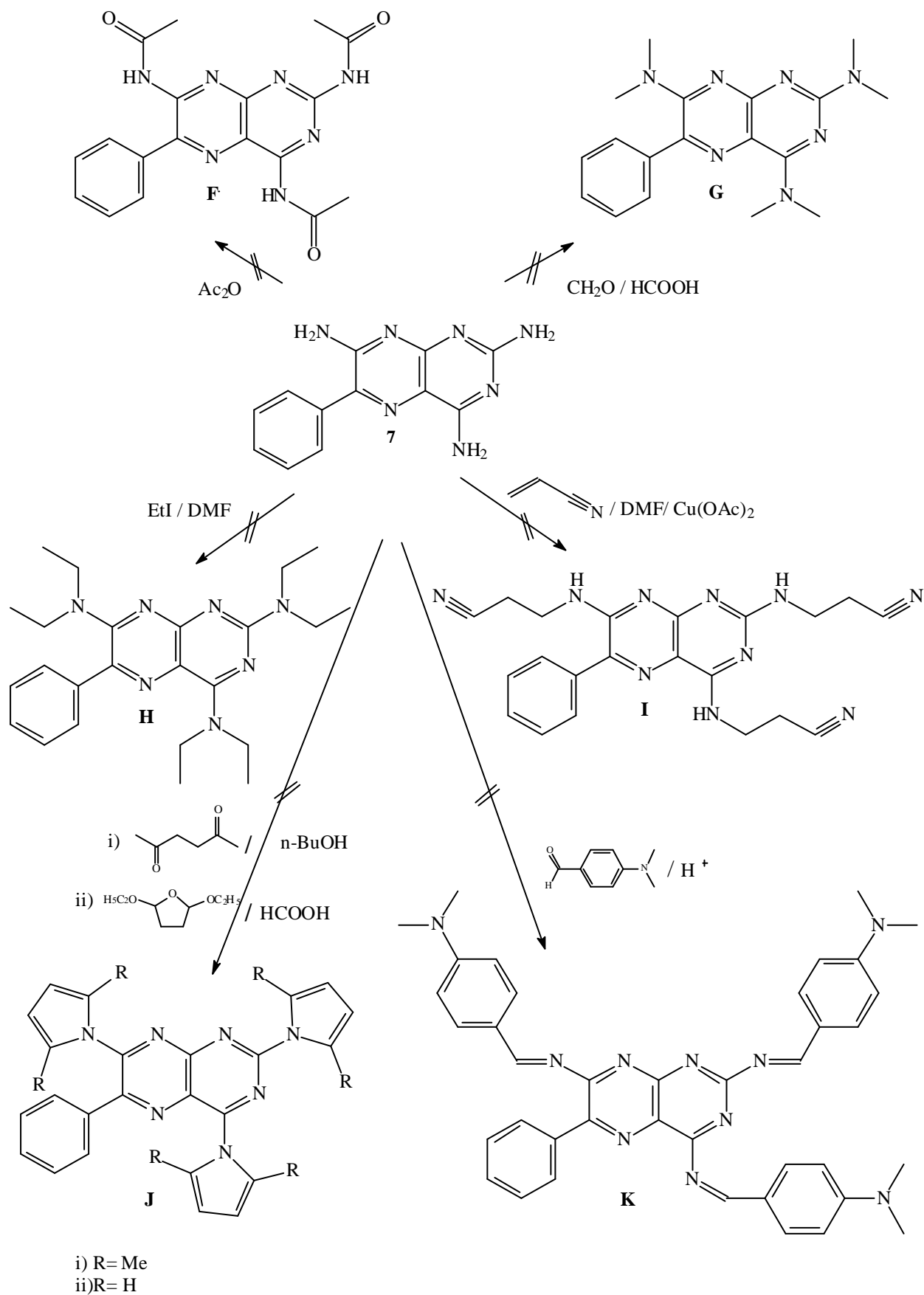
Durch reduktive Aminierung nach *Eschweiler/Clarke*^[19] sollten tertiäre Amine (**G**) hergestellt werden. Durchgeführt wurde die Reaktion mit einer 36% Formaldehydlösung und 85% Ameisensäure, als auch mit Paraformaldehyd und Ameisensäure 99%. Auch hier zeigte die dc-Kontrolle (FM 2) ein zu komplexes Produktgemisch. Ähnliche Ergebnisse lieferte der Versuch der Ethylierung mit Ethyliodid in DMF.

Alkylierung von primären Aminen durch Addition an Acrylnitril in Anwesenheit von Kupferacetat als Katalysator wird in der Literatur am Beispiel Anilin beschrieben^[20]. Der Versuch der Umsetzung mit **7** zu 3-(2,4-bis[(2-Cyanoethyl)amino]-6-phenyl-7-pteridiny)amino)propannitril (**I**) zeigte neben dem Edukt ein Gemisch aus 6 Produkten, wobei es ebenfalls auf Grund der schlechten Löslichkeit nicht gelang diese zu trennen.

Nach *Paal-Knorr*^[21] entstehen durch Erhitzen von 1,4 Diketonen mit Ammoniak 2,5-Dialkyl- bzw. Diaryl-pyrrole. Setzt man statt Ammoniak primäre Amine ein, so erhält man die betreffenden *N*-Substitutionsprodukte. Im Triamteren (**7**) sollten die Aminogruppen mit Acetonylaceton in *n*-Butanol zum Pyrrol **J** (R=Me) cyclisiert werden. Gearbeitet wurde mit äquimolaren Mengen als auch im Überschuß mit dem Diketon. Die dc Untersuchungen (FM 2) zeigten, daß kaum eine Umsetzung erfolgt war und auch der Zusatz von *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator zeigte keine Verbesserung. Um eventuell durch höhere Temperatur zur Umsetzung zu gelangen, wurde in DMF in Anwesenheit von Molsieb 3Å gearbeitet, um das entstehende Wasser dem Ansatz zu entziehen^[22]. Das Ergebnis lieferte zwar eine verbesserte Reaktion, jedoch entstanden 6 Produkte, wobei es auf Grund der schweren Löslichkeit wieder nicht gelang, diese zu trennen. Der Versuch, durch Umsetzung mit 2,5-Diethoxytetrahydrofuran in Ameisensäure 99% das Pyrrol **J** (R=H) zu erhalten, scheiterte ebenfalls auf Grund der Fülle an Produkten.

Azomethine (**K**) sollten durch Reaktion mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd gebildet werden. Es wurde in Ameisensäure 99% als auch in verdünnter Schwefelsäure gearbeitet, bei Raumtemperatur und unter Rückfluß, jedoch erfolgte keine Umsetzung zu dem gewünschten Produkt **K**. Es wird vermutet, daß nach Protonierung von **7** an N-1 zu einem durch Mesomerie stabilisierten Kation ein nucleophiler Angriff der Aminogruppen am Carbonyl-Kohlenstoff des Aldehyds verhindert wird.

Ein Versuch der Diazotierung von Triamteren (**7**) wurde unterlassen, denn in der Literatur wird bereits beschrieben, daß dieses nicht möglich ist^[18].

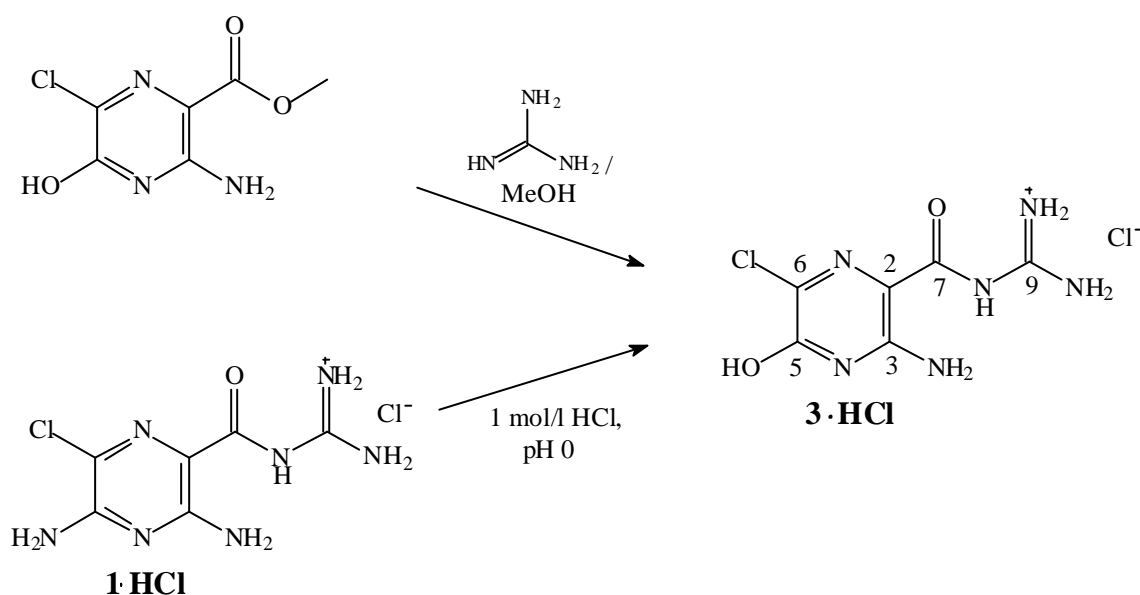


Schema 12 : Derivatisierungsversuche der Modells substanz Triamteren 7

3.1.4 Zersetzungsprodukte von Amiloridhydrochlorid in wässriger Lösung

3.1.4.1 Synthese der Verbindungen **3** und **4** ausgehend von Amilorid (**1**)

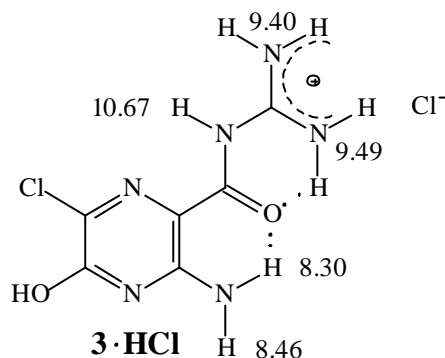
Nach Mazzo^[8] entstehen aus Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) in wässriger Lösung bei erhöhten Temperaturen und unterschiedlichen pH-Werten drei Zersetzungsprodukte (*Schema 1*). So soll das *N*''[(3-Amino-6-chlor-5-hydroxy-2-pyrazinyl)carbonyl]guanidin (**3**) durch saure Hydrolyse bei pH < 1 gebildet werden. Die Synthese dieser Verbindung **3** wird in der Literatur durch Umsetzung von Methyl 3-Amino-6-chlor-5-hydroxy-2-pyrazincarboxylat mit Guanidin in Methanol beschrieben^[9] (*Schema 13*).



Schema 13: Darstellung von **3·HCl**

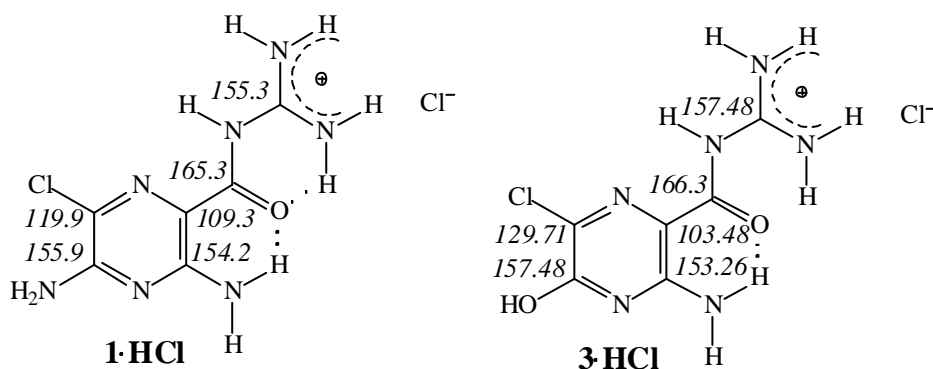
Es sollte nun versucht werden, ausgehend von **1·HCl** zur Hydroxypyrazin-Verbindung **3** zu gelangen. Dazu wurde **1·HCl** in 1 mol/l Salzsäure (pH = 0) 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt (*Schema 13*). Es war zu beobachten, daß nach einigen Stunden aus der siedenden Lösung eine gelbliche, kristalline Substanz ausfiel. Die dc Untersuchung zeigte bei der Detektion unter UV-Licht bei 365 nm eine fluoreszierende Substanz mit einem R_f -Wert von 0,28 im Vergleich zum Edukt **1·HCl** mit einem R_f -Wert von 0,38 (FM 3). In der Literatur findet man Angaben zum Schmelzpunkt (>300 °C) und zur Elementaranalyse^[9] für das Hydrochlorid der Verbindung **3**. Da der Schmelzpunkt der isolierten Substanz unter Verwendung des Kofler-Heiztischmikroskops bei 350 °C noch nicht erreicht war,

wurde angenommen, ebenfalls das Hydrochlorid der Verbindung **3** isoliert zu haben, was durch die Elementaranalyse bestätigt wurde. NMR-spektroskopische Untersuchungen waren nur im deuterierten Hexamethyl-phosphorsäuretriamid möglich, da es sich um eine extrem schwer lösliche Verbindung handelt. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt 5 Singulets, die ein Verhältnis von 1 ($\delta = 10.67$) : 2 ($\delta = 9.49$) : 2 ($\delta = 9.40$) : 1 ($\delta = 8.46$) : 1 ($\delta = 8.30$) aufzeigen. Es wird davon ausgegangen, daß in der Verbindung **3·HCl** die Seitenkette in der Acylaminostruktur vorliegt, wie sie auch im Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) zu finden ist (Schema 14), so daß die Signale bei $\delta = 9.49$ und $\delta = 9.40$ den beiden Aminogruppen dieser Seitenkette zugeordnet werden können.



Schema 14 : ^1H -Verschiebungen von **3·HCl**

Die NH_2 -Gruppe in Position 3 spaltet zu zwei Signalen bei $\delta = 8.46$ und $\delta = 8.30$ auf, da ein Proton eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Lösungsmittel eingehen kann. Das Singulett bei 10.67 wird dem Amidproton der Seitenkette zugeordnet. Die OH-Gruppe mit einen pK_a -Wert von 5.45^[23] besitzt höhere Acidität und diese Art von Protonen zeigen sehr häufig breite Resonanzsignale, die unter Umständen im Rauschpegel verschwinden. Die Signalzuordnung im ^{13}C -NMR wurde durch Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) (Schema 15) vorgenommen.

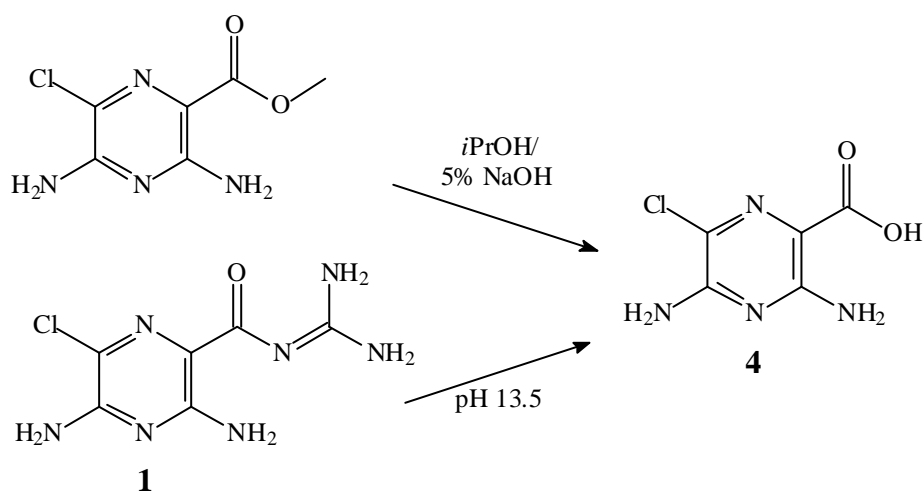


Schema 15 : ^{13}C -Verschiebungen von **1·HCl** und **3·HCl**

Zu sehen sind im Spektrum statt der erwarteten 6 nur 5 Signale. Sie werden bei $\delta = 103.48$, $\delta = 129.71$ und $\delta = 153.26$ den C-Atomen 2, 6 und 3 zugeordnet, da sich diese nicht merklich von jenen im **1·HCl** unterscheiden. Die chemische Verschiebung bei $\delta = 166.3$ ist typisch für Carbonylfunktionen in Amiden, Estern oder auch Harnstoffderivaten^[24] und weicht nur um 1 ppm von der Carbonylfunktion im **1·HCl** ab, so daß sie dem C-7 zugeordnet wird. Die C-Atome 9 und 5 zeigen im **1·HCl** in ihrer chemischen Verschiebung kaum Unterschiede (155.3 C-9, 155.7 C-5) (*Schema 15*), so daß sie in der Verbindung **3·HCl** bei $\delta = 157.48$ als ein Signal auftreten.

Das Massenspektrum (EI) zeigt für **3·HCl** als Molpeak m/z 230/232 für die Base. Die Fragmentierungsreaktionen entsprechen denen von Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) (*Schema 9*). Die Seitenkette wird schrittweise abgebaut, indem Ammoniak, Cyanamid, Amidinoisocyanat und ein Diaminomethylenaminoylradikal abgespalten werden. Man findet also die entsprechenden charakteristischen Peaks des Fragmentierungsschemas von Amilorid auf Grund des Austausches einer Amino-Gruppe gegen eine Hydroxyl-Gruppe um eine Masseneinheit größer.

Die 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (**4**), welche bei einem pH-Wert > 13 aus Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) nach Mazzo^[8] erhalten werden soll (*Schema 1*), wird in der Literatur durch Hydrolyse von Methyl-3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxylat dargestellt^[10] (*Schema 16*).



Schema 16: Darstellung von 4

Durch mehrstündiges Erwärmen bei einem pH-Wert von 13,5 konnte die Säure **4** ausgehend vom Amilorid (**1**) erhalten werden. Auf der DC-Platte zeigte sich bei 365 nm das fluoreszierende Produkt mit einem R_f -Wert von 0.58 (FM 3).

Das Proton der Säuregruppe erscheint bei tiefen Feld im ^1H -NMR und im Aromatenbereich erhält man ein Signal für die chemisch äquivalenten Aminogruppen. Die ^{13}C -Verschiebungen entsprechen den von Smith^[11] veröffentlichten Daten, wobei die Zuordnung für C-3 und C-5 nicht sicher ist.

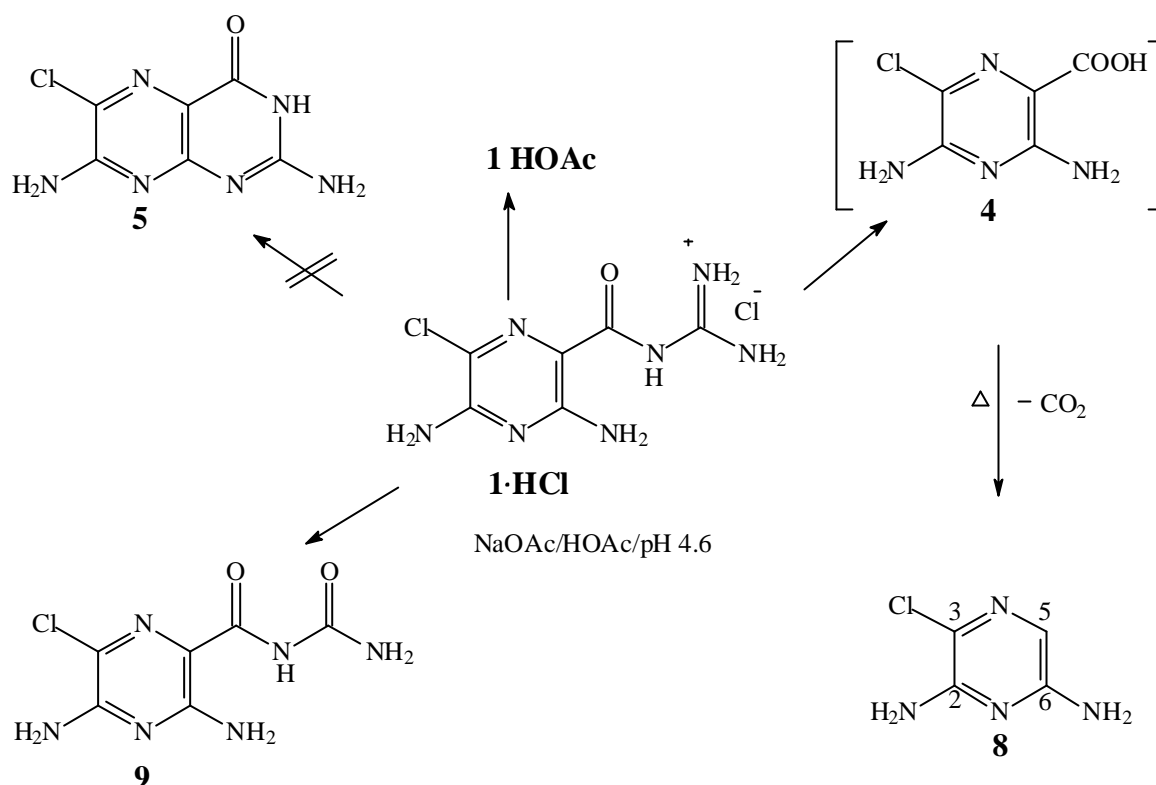
Im MS (EI) findet man bei m/z 188/190 den Molpeak für die 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (**4**) und unter Abspaltung von CO_2 einen intensitätsstarken Peak bei $\text{M}^{+\bullet}-44$ für das Pyrazin-Kation (m/z 144/146).

3.1.4.2 Synthese der Verbindung **5** ausgehend von Amilorid

Aus Amiloridhydrochlorid (**1**·HCl) soll nach Mazzo^[8] bei pH 4-5 Cyclisierung zum 2,7-Diamino-6-chlor-4(3*H*)-pteridinon (**5**) eintreten (*Schema 1*). Diese Substanz **5** wird in der Literatur nicht beschrieben und es soll zunächst versucht werden, sie ausgehend von **1**·HCl herzustellen. Dazu wurde **1**·HCl in einem Acetat-Puffer pH 4.6 unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen kristallisierte eine bräunliche Substanz aus, die auf der DC bei einer Detektion bei 365 nm fluoreszierte und in verschiedenen Fließmitteln (FM 1-3) das gleiche Fließverhalten wie das Edukt **1**·HCl aufzeigte.

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung war nicht möglich, denn die Substanz ließ sich in keinem für NMR-Vermessungen gängigen Lösungsmittel lösen.

Im MS (EI) fand man als Molpeak m/z 229/231 für die Base Amilorid (**1**) und auch das Fragmentierungsschema entsprach diesem. Die schwerlösliche Verbindung begann bei 240 °C, wie auch die Amilorid-Base (**1**), unter Zersetzung zu schmelzen, jedoch wurden Unterschiede beim Vergleich der IR-Spektren festgestellt. Es konnte sich also auf Grund der Löslichkeit und der Unterschiede im IR-Spektrum nicht um Amilorid-Base bzw. Amiloridhydrochlorid handeln. Somit wurde die Überlegung angestellt, daß es sich bei der Verbindung um schwerlösliches Amiloridacetat (**1**·HOAc) handeln könnte (*Schema 17*), was durch die Elementaranalyse bestätigt wurde.



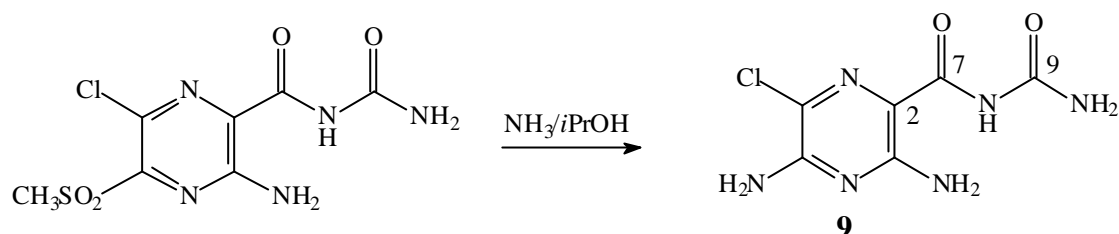
Schema 17: Umsetzung von **1·HCl** im Acetatpuffer pH 4.6

Bei der dc Untersuchung (FM 4) der Reaktionslösung zeigte sich ein Produkt mit einem R_f -Wert von 0.2 und ein Zweites bei 0.3, das aus alkalischer Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt werden konnte. Bei dieser Substanz handelt es sich um das 3-Chlor-2,6-pyrazindiamin (**8**) (Schema 17). Im ^1H -NMR-Spektrum werden die Signale bei $\delta = 5.98$ und $\delta = 6.07$ mit der Intensität von 2 Protonen den Aminogruppen zugeordnet, die nach D_2O -Zugabe gelöscht werden. Als drittes Signal ($\delta = 6.86$) mit einer Intensität von 1 wird das Proton in Position 5 registriert.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind 4 C-Atome zu erkennen, wobei mit Hilfe des DEPT-Spektrums das Signal bei $\delta = 117.29$ dem tertiären C-Atom zuzuordnen ist. Die Verschiebungen für C-2 ($\delta = 150.21$), C-3 ($\delta = 116.74$) und C-6 ($\delta = 154.23$) sind vergleichbar mit denen von 3-Chlor-5-iod-2,6-pyrazindiamin^[25], wobei die Zuordnung von C-2/C-3 nicht sicher ist.

Im MS (EI) ist der Molpeak bei m/z 144/146 zu erkennen und unter Abspaltung von HCN ein weiterer intensitätsstarker Peak bei m/z 117/119. Es muß Hydrolyse zur 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (**4**) mit anschließender Decarboxylierung erfolgt sein, um von **1·HCl** zum 3-Chlor-2,6-pyrazindiamin (**8**) zu gelangen.

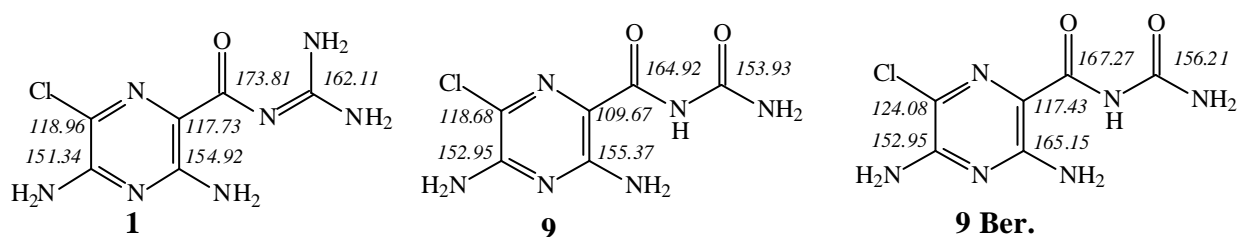
Das Produkt mit dem kleinerem R_f -Wert wurde bei pH 6 mit *tert*-Butylmethylether ausgeschüttelt. Hierbei handelt es sich um das Hydrolyseprodukt *N*-[(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]harnstoff (**9**) (Schema 17). Es wird in der Literatur durch Umsetzung von *N*-{[3-Amino-6-chlor-5-(methylsulfonyl)-2-pyrazinyl]carbonyl}harnstoff in 2-Propanol mit Ammoniak



erhalten^[26] (Schema 18).

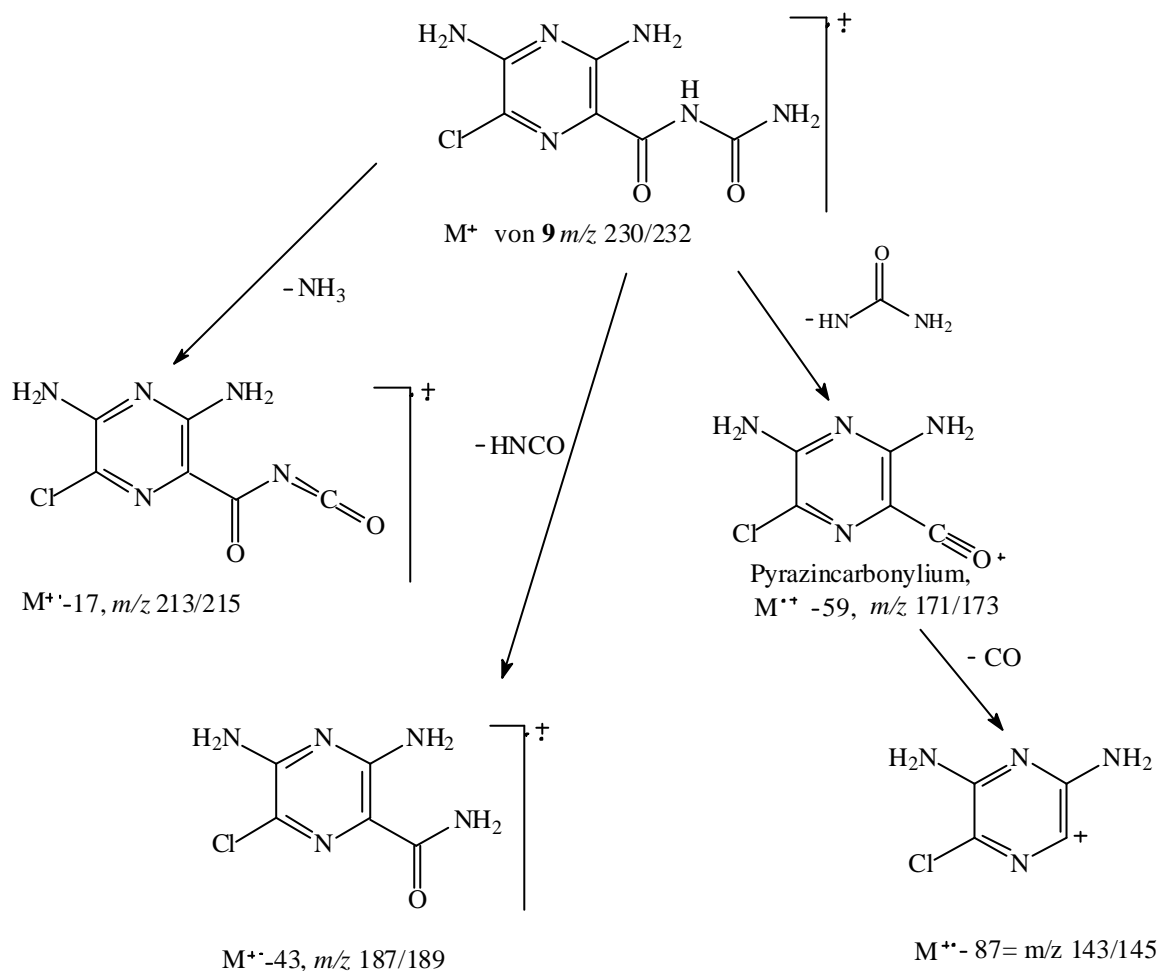
Schema 18: Literaturbekannte Synthese von **9**

Bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung findet man im ^1H -NMR 3 Signale in einem Verhältnis 1:1:5. Das Proton im Ureid der Seitenkette wird durch zwei Carbonylgruppen stark entschirmt und somit dem Signal im tiefsten Feld bei $\delta = 8.84$ zugeordnet. Die Substanz fluoresziert bei der dc Untersuchung bei 365 nm und somit muß sich über Wasserstoffbrücken, ähnlich dem Amilorid (**1**) (Schema 4), ein planares System ausbilden. Die freie Rotation der Aminogruppe in Position 3 ist somit nicht möglich, so daß man für sie ein Signal bei $\delta = 7.68$ und ein zweites bei $\delta = 7.33$ zusammen mit den noch fehlenden Aminogruppen erhält. Die Zuordnung der ^{13}C -Signale wurde anhand von Berechnungen^[27] und durch Vergleich mit Daten von **1** getroffen. Die chemischen Verschiebungen für C-2, C-5, C-6 und C-7 stimmen mit den berechneten Werten als auch mit denen des Amilorids (**1**) gut überein (Schema 19). Bei der nicht ganz eindeutigen Zuordnung für die verbleibenden C-9 und C-3 wurde sich nach den Berechnungen gerichtet, wobei C-9 bei höherem Feld als C-3 erscheint.



Schema 19: ^{13}C -Verschiebungen von Amilorid (**1**) und Verbindung **9**

Als Molpeak findet man für das Harnstoffderivat **9** im MS (EI) m/z 230/232 (Schema 20). Es wird auch hier die Seitenkette über Eliminierung von Ammoniak abgebaut, so daß man das 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonyl-isocyanat mit m/z 213/215 als Peak erhält. Mit $M^{+•} - 43$ (Isocyansäure) erhält man, wie für Amilorid auch (Schema 9), das Fragment m/z 187/189 für 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxamid. An dieser Stelle unterscheidet sich das Fragmentierungsschema der Verbindung **9** von der Verbindung **3** mit gleicher Molmasse. Des weiteren treten die gleichen Fragmentationen wie bei **1** auf (m/z 171/173, m/z 143/145 unter Abspaltung eines Harnstoff- und *N*-Formylharnstoff-Radikals (Schema 20).



Schema 20: Fragmentierungsreaktion von **9**

Wurde **1·HCl** im Acetatpuffer bei 80 °C (20 Stunden) oder im geschlossenem Pyrexglas bei 100 °C (5 Stunden) erhitzt, so entstand ebenfalls schwerlösliches Amiloridacetat (**1·HOAc**) und die dc Untersuchung (FM 3) der Reaktionlösungen zeigte neben dem Edukt Amilorid (**1**) auch die Produkte **8** und **9**.

Um nicht mit einem Puffer arbeiten zu müssen, aber dennoch zu gewährleisten, daß der pH-Wert konstant (pH 4.5) gehalten wird, sollte der Versuch mit Hilfe einer pH-Stat-Anlage durchgeführt werden (Abb.5). Eine wässrige Lösung von Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) wurde auf pH 4.5 eingestellt und mit einer Glaselektrode kontinuierlich gemessen. Tritt Cyclisierung zum gewünschten Produkt **5** ein, so wird Ammoniak frei. Die damit verbundene pH-Wert-Änderung sollte über die automatische Zugabe von Säure aus dem Vorratsgefäß abgefangen werden. Laut Hersteller sind kombinierte pH-Elektroden nur bei Messungen von 0-70 °C geeignet, so daß 4 Tage bei einer Temperatur von 70 °C gerührt wurde. Nach ½ Tag war jedoch ein pH- Wert < 4.5 zu beobachten, so daß die Säure im Vorratsgefäß durch Lauge ersetzt wurde. Nach 4 Tagen wurde **1·HCl** abfiltriert. Die dc Untersuchung (FM 3) der Reaktionlösung lieferte eine Erklärung für den sauren pH. Neben dem Edukt waren die Carbonsäure **4** und in ganz geringer Konzentration drei weitere Produkte zu erkennen.

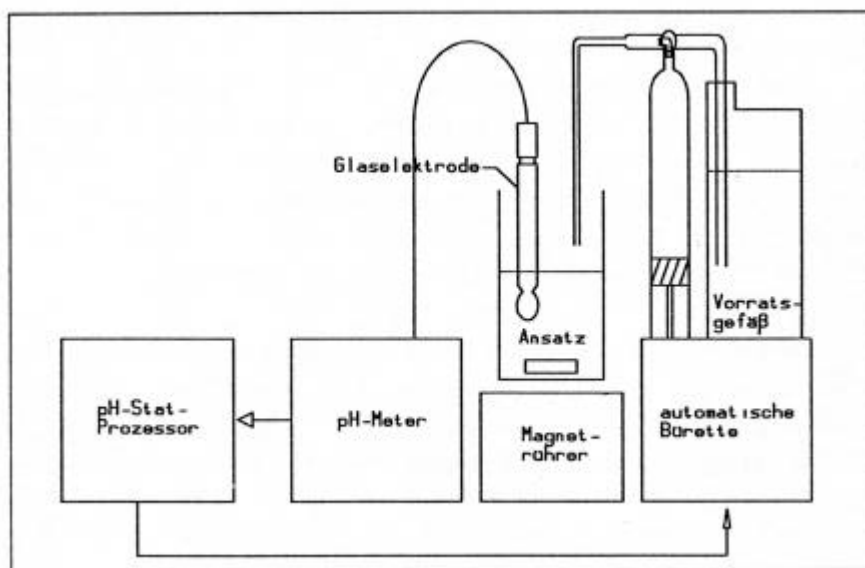
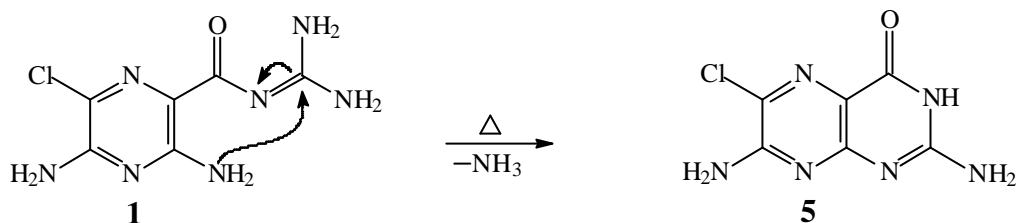


Abb.5: Schematischer Aufbau pH-Stat-Anlage

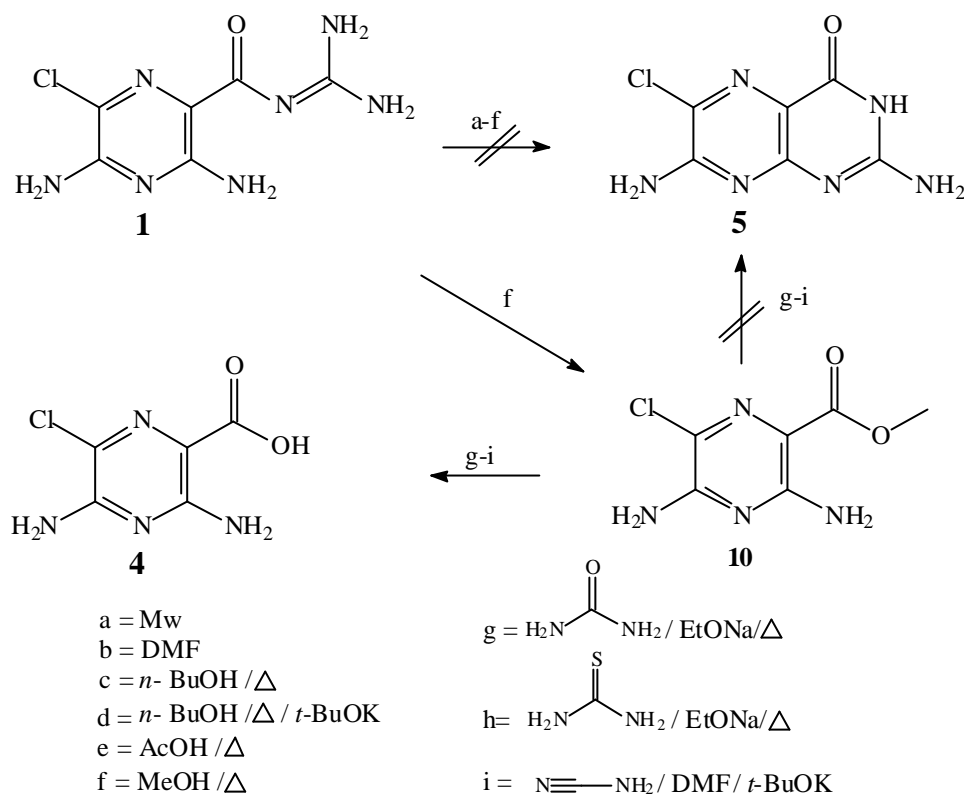
3.1.4.2 pH-unabhängige Synthese der Verbindung **5**

Die Versuche, ausgehend von Amilorid (**1**) bei pH 4-5 zum gewünschten Cyclisierungsprodukt **5** zu gelangen, zeigten nicht den gewünschten Erfolg, so daß im Folgenden pH-unabhängig das Pteridinon **5** aus **1** hergestellt werden sollte. Es wurde zunächst versucht, **1** durch Erhitzen sowohl trocken als auch in Lösungsmitteln zum Produkt **5** zu cyclisieren (*Schema 21*). Durch nucleophile Addition der NH₂-Gruppe in Position 3 an die Guanidingruppe sollte unter Abspaltung von Ammoniak das Produkt **5** erhalten werden.



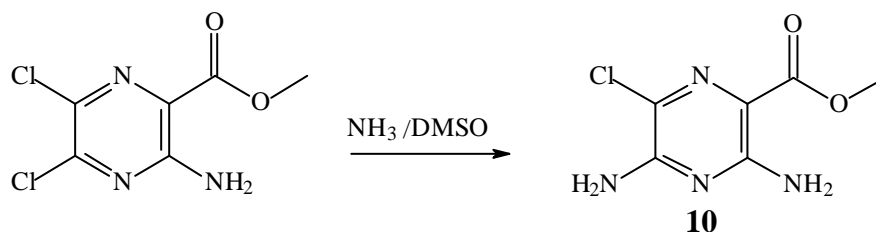
Schema 21

Zunächst wurde **1** in einer 800 W Mikrowelle bei höchster Leistungseinstellung fünfzehn Minuten lang erhitzt (*a*, *Schema 22*). Nach ca. zehn Minuten begann sich die Substanz rot zu färben. Das schwerlösliche rote Pulver bestand aus zwei fluoreszierenden Produkten und der Ausgangsverbindung (FM 3). Es ist auf Grund der Schwerlöslichkeit nicht gelungen, die Produkte zu trennen. Dann wurde Amilorid (**1**) mehrere Stunden in DMF unter Rückfluß erhitzt (*b*, *Schema 22*). Die Untersuchung der Reaktionslösung mit FM 3 zeigte neben dem Ausgangsstoff fünf Produkte. Beim Erhitzen in *n*-Butanol (*c*, *d*, *Schema 22*) entstand neben dem Edukt ein komplexes Gemisch aus mindestens neun Produkten (FM 2) und auch der Zusatz katalytischer Mengen von Kaliumtertiärbutanolat lieferte kein anderes Ergebnis. In Eisessig (*e*, *Schema 22*) trat bei Raumtemperatur keine Reaktion ein und nach mehrstündigem Erhitzen erhielt man neben dem Edukt ebenfalls eine Vielzahl an Produkten.



Schema 22: pH-unabhängige Cyclisierungsversuche

Um die Zahl der Produkte zu verringern, wurde die Reaktion bei niedrigeren Temperaturen in Methanol durchgeführt. Tatsächlich entstand nur ein fluoreszierendes Produkt mit einem R_f Wert von 0.52 (FM 2). Es handelt sich hierbei um das Methyl-3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxylat (**10**) (*f*, Schema 22), das ausgehend von Methyl 3-amino-5,6-dichlor-2-pyrazincarboxylat durch Einleiten von Ammoniak hergestellt wurde^[9] (Schema 23).

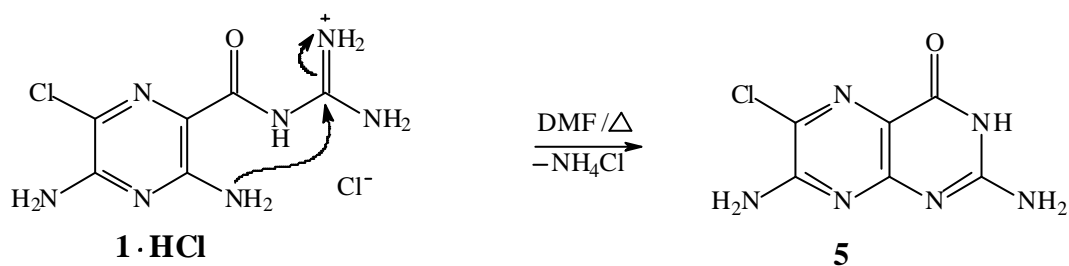
Schema 23 : Darstellung von **10**

Im ^1H -NMR-Spektrum ist für den Ester **10** das Signal für die Methylgruppe bei $\delta = 3.73$ zu erkennen und die Protonen der beiden Aminogruppen erscheinen bei $\delta = 7.10$ und 7.20 . Die gefundenen ^{13}C -NMR Daten stimmen mit den Literaturangaben sehr gut überein^[11].

Das Massenspektrum zeigt als Molpeak m/z 202/204 und unter Abspaltung eines Methoxyradikals das Pyrazincarbonylium-Ion bei m/z 171/173. Ein weiterer intensitätsstarker Peak tritt bei m/z 144/146 ($M^{+\bullet} - 58$) für das Pyrazin-Kation auf.

Um die Reaktivität des Methylesters **10** zu prüfen, wurde sowohl mit Harnstoff als auch mit Thioharnstoff umgesetzt, wobei Natriummethanolat den nucleophilen Angriff begünstigen sollte (g, h, *Schema 22*). Unter Eliminierung von Methanol und Wasser bzw. Schwefelwasserstoff sollte **5** gebildet werden. Nach vierstündigem Erhitzen wurde bei der dc Untersuchung (FM 2) neben einem Produkt mit einem R_f -Wert von 0.29 noch sehr viel Edukt gefunden, so daß weiter erhitzt wurde. Nach weiteren zwei Stunden begann die Lösung trübe zu werden und nach dem Abkühlen wurde eine gelbliche Substanz abfiltriert, die sich in Wasser löste und durch Zugabe von Säure wieder gefällt werden konnte. So wurde vermutet, daß Hydrolyse des Esters **10** zur Carbonsäure **4** erfolgt war und es sich um das Natriumsalz der 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (**4**) handelte (*Schema 22*). Die spektroskopischen Daten bestätigten diese Vermutung. Die Reaktion des Esters mit Cyanamid in DMF und Kaliumtertiärbutanolat als Katalysator lieferte anstelle des erwarteten Produkts **5** ebenfalls als Hauptprodukt die Säure **4** (i, *Schema 22*). Auf der DC (FM 3) waren in geringen Konzentrationen vier weitere Produkte neben dem Edukt zu erkennen

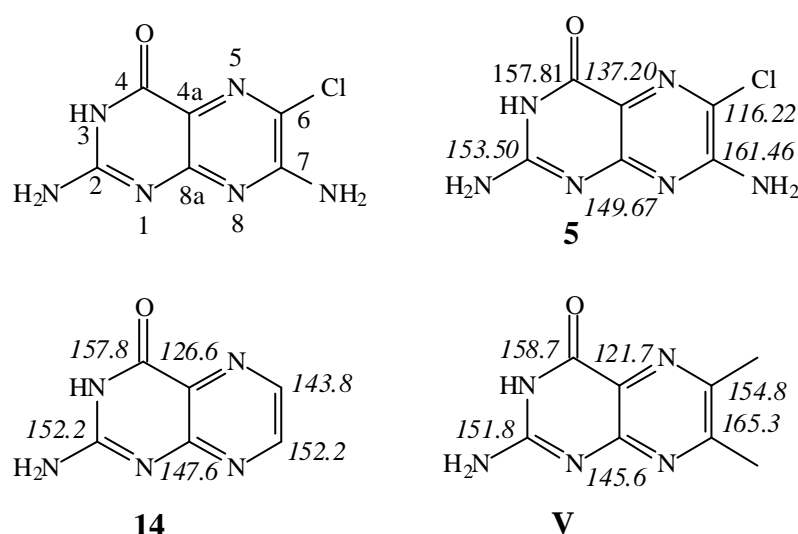
Daraufhin wurde Amiloridhydrochlorid (**1·HCl**) als Edukt eingesetzt, denn das durch Mesomerie stabilisierte Kation müßte den nukleophilen Angriff am C-9 durch die Aminogruppe in Position 3 begünstigen (*Schema 24*).



Schema 24

Wurde **1·HCl** in DMF unter Rückfluß erhitzt, so war nach vier Stunden zu beobachten, daß aus der heißen Lösung eine gelbe Substanz ausfiel. Laut der dc Untersuchung handelt es sich um ein blau fluoreszierendes Produkt mit einem R_f -Wert von 0.65 (FM 3). Das MS (EI) zeigte den gewünschten Molpeak m/z 212/214 des Pteridinons **5** und ein wichtiges Fragmentation bei m/z 171/173 (Pyrazincarbonylium), das unter Abspaltung eines Carbodiimid-Radikals ($M^{+\bullet} - 41$) entstanden sein

muß. Da die Substanz bereits in der Hitze aus DMF ausgefallen ist, handelt es sich um eine sehr schwerlösliche Verbindung. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung war deshalb in neutralem Medium wie $[D_6]DMSO$ oder $[D_{18}]HMPA$ nicht möglich. Das ^{13}C - NMR-Spektrum mußte in deuterierter Trifluoressigsäure aufgenommen werden, wodurch sich ein 1H -NMR-Spektrum erübrigte. Die Auswertung des Spektrums erfolgte durch Vergleich mit Spektren von 2-Amino-4(3*H*)-pteridinon (**14**) und 2-Amino-6,7-dimethyl-4(3*H*)-pteridinon (**V**)^[28], die ebenfalls in deuterierter Trifluoressigsäure NMR-spektroskopisch vermessen wurden (*Schema 25*).



Schema 25: ^{13}C -Verschiebungen von **5** und Referenzsubstanzen **14** (vgl. *Schema 26*), **V**

Günther^[29] und Mitarbeiter haben aus Protonierungsverschiebungen der ^{13}C -Resonanzen und den Änderungen der ^{13}C , 1H -Kopplungskonstanten gezeigt, daß bei Pterinen in Trifluoressigsäure einfache Protonierung an N-1 stattfindet. Betrachtet man die Verbindung **5**, so stellt sich die Frage, ob ebenfalls einfache Protonierung an N-1 oder aber an N-8 erfolgt, da dort eine Amidinstuktur vorliegt. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt 6 quartäre C-Atome und die gefundenen chemischen Verschiebungen für C-2 ($\delta = 153.50$) und C-4 ($\delta = 157.81$) stimmen mit denen der Verbindung **14** und **V** sehr gut überein (*Schema 25*). Die Einführung von Substituenten in Position 6 und 7 der Referenzsubstanz **V** führt zur erwarteten Entschirmung, wobei das Signal für C-7 im tiefsten Feld erscheint. Somit wurde der Verbindung **5** ebenfalls der im tiefsten Feld gelegene Wert ($\delta = 161.46$) der Position 7 zugeordnet. Anders als bei den Referenzsubstanzen erhält C-6 im Pteridinon **5** den Wert der kleinsten chemischen Verschiebung ($\delta = 116.22$). Dieser Bereich ist typisch für Chlor-

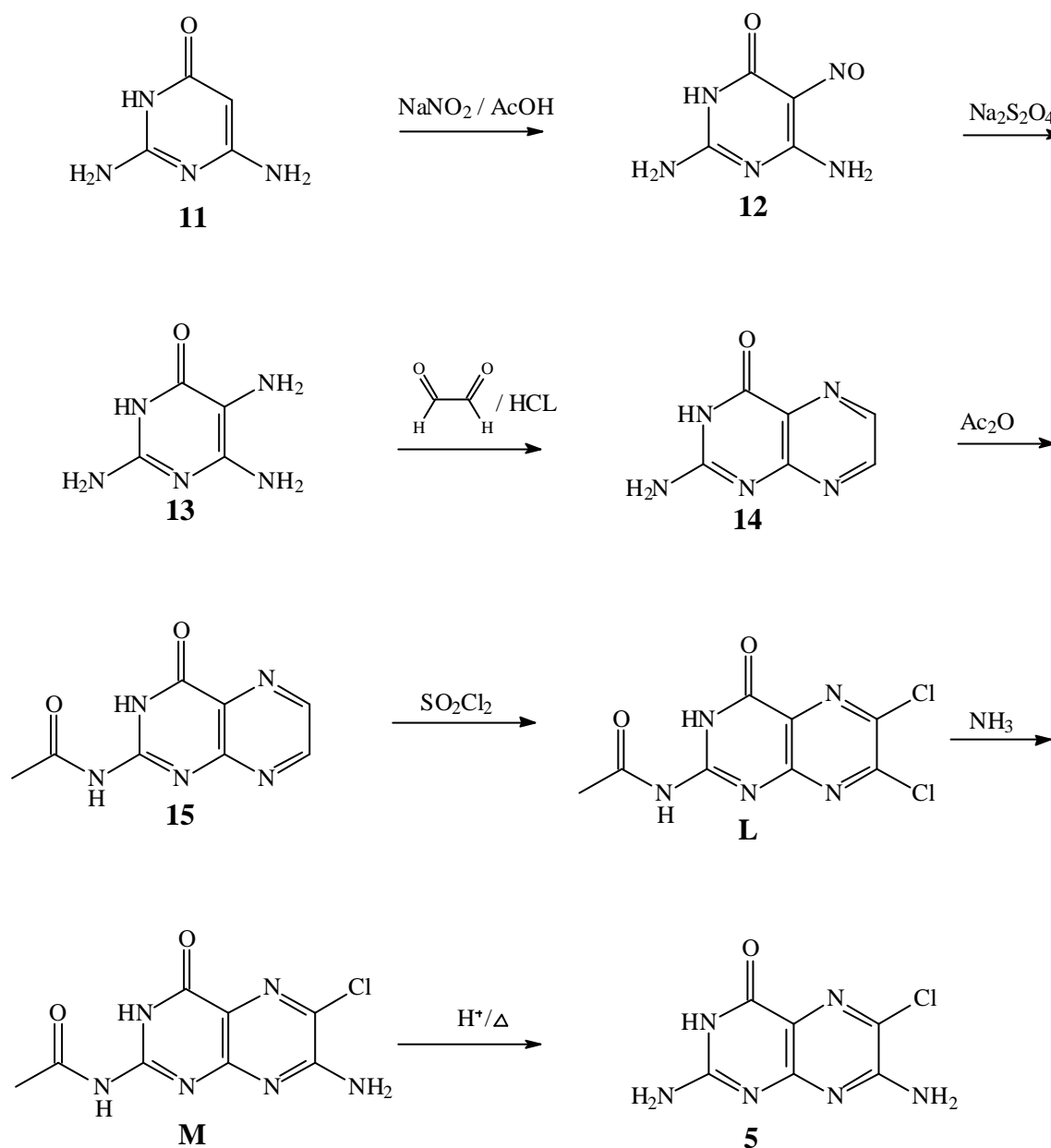
substituierte Pyrazine wie man z.B. anhand des Signals im Amilorid (**1**) (*Abb. 2*) oder des Diaminochlorpyrazin **9** feststellen kann. Wie auch bei **14** und **V** wird δ (8a) > δ (4a) gewählt und so wird $\delta = 149.67$ dem C-8a und $\delta = 137.20$ dem C-4a zugeordnet. Berechnet man die chemischen Verschiebungen mit Hilfe der Inkrementmethode würde man jedoch den Wert der kleinsten chemischen Verschiebung $\delta = 116.22$ dem C-4a und dementsprechend $\delta = 137.20$ dem C-6 zuordnen.

Es wurde nun noch einmal das rotgefärbte Pulver des Mikrowellen-Versuchs mit dem erhaltenen Pteridinon **5** dc verglichen. Im FM 3 als auch im FM 4 zeigte ein Produkt des roten Pulvers den gleichen R_f -Wert wie Verbindung **5**.

3.1.4.4 Synthese der Verbindung **5**

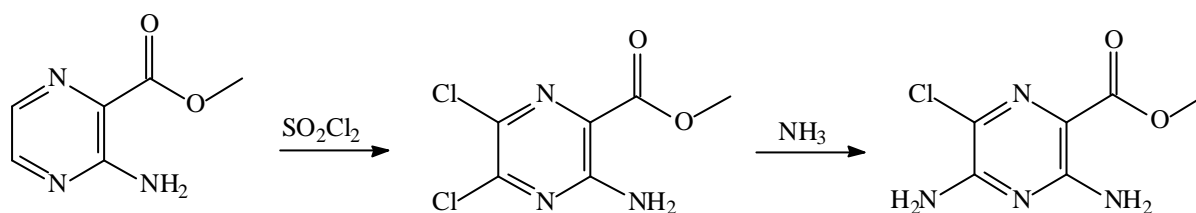
Um mit einer Röntgenstrukturanalyse zu beweisen, daß es sich bei der Verbindung **5** tatsächlich um das 2,7-Diamino-6-chlor-4(3*H*)-pteridinon handelt, sollten Einkristalle gezüchtet werden. Der aus DMSO erhaltene Einkristall war jedoch für eine Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet. Vorläufige Aufnahmen zeigten, daß der Kristall sehr schwach streute und eine extrem lange Achse hatte. Es handelte sich mit ziemlicher Sicherheit um einen nicht meßbaren Zwilling.

Deshalb wurde überlegt, das Pteridinon **5** zu synthetisieren, um durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz den Strukturbeweis zu erbringen. Als Ausgangsverbindung der Synthese wurde das 2,6-Diamino-4(3*H*)-pyrimidinon (**11**) gewählt (*Schema 26*), das mit Natriumnitrit und verdünnter Essigsäure in Position fünf zum 2,6-Diamino-5-nitroso-4(3*H*)-pyrimidinon (**12**) nitrosiert werden kann^[30]. Eine Diazotierung in Position 6 wird ausgeschlossen, da es sich bei **11** um ein vinyloges Säureamid handelt. Im nächsten Schritt erfolgt mit Hilfe von Natriumdithionit eine Reduktion der Nitrosogruppe, um das 2,5,6 Triamino-4(3*H*)-pyrimidinon (**13**) zu erhalten^[30]. Das Pterin (**14**) wird durch Umsetzung mit Glyoxal unter saurer Katalyse gebildet^[31], und im Anschluß wird es zu Verbindung **15** acetyliert^[32].



Schema 26 : Syntheseplan 1 der Verbindung 5

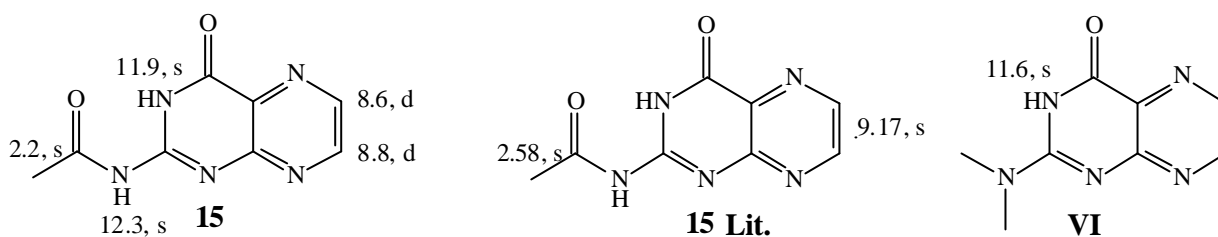
Cragoe^[9] und Mitarbeiter überführen das Methyl 3-amino-2-pyrazincarboxylat (Schema 27) mit Sulfurylchlorid in das Methyl 3-amino-5,6-dichlor-2-pyrazincarboxylat. Anschließend wurde das 5-Chlor als vinyloges Säurechlorid durch Einleiten von Ammoniak durch eine Aminogruppe substituiert.



Schema 27

Ebenso sollte mit dem acetylierten Pterin **15** verfahren werden. Mit Hilfe von Sulfurylchlorid müßte zunächst zweifach chloriert (**L**, Schema 26) und im Anschluß das Chloratom der Position 7 durch eine Aminogruppe ersetzt werden. So würde man das *N*-(7-Amino-6-chlor-4-oxo-3,4-dihydro-2-pteridiny)acetamid (**M**) und im letzten Schritt das Produkt **5** nach Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe erhalten.

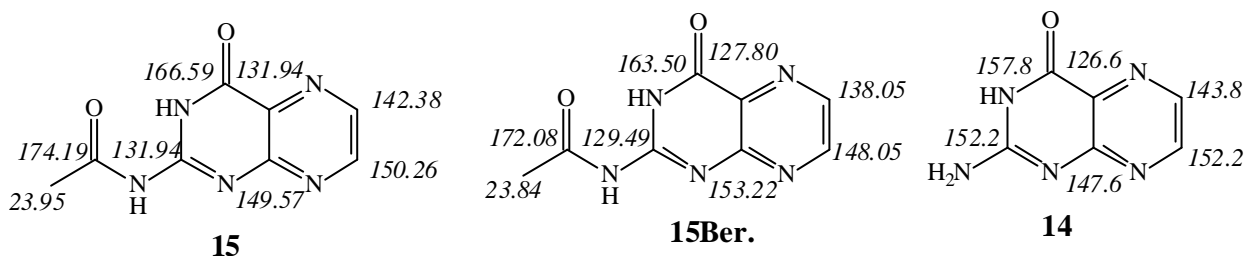
Die Verbindung **11** ist kommerziell erhältlich. Die rosafarbene Nitrosoverbindung **12** und das nach Reduktion hellgelbe Pyrimidinon **13** konnten in 95%iger bzw. 92%iger Ausbeute hergestellt werden. Vom äußerst schwerlöslichen Pterin **14** wurde ein MS (EI) aufgenommen. Es enthielt den gewünschten Molpeak bei m/z 163 und entsprach auch sonst den von Williams und Ayling^[33] veröffentlichten Fragmentierungsreaktionen. Das UV-Spektrum (0.1 mol/l NaOH) der Verbindung entsprach dem Referenzspektrum^[32]. Nachdem **14** mehrere Stunden in Acetanhydrid unter Rückfluß erhitzt wurde, konnte die acetylierte Verbindung **15** isoliert werden. Sie zeigte bei der Untersuchung im FM 3 einen R_f -Wert von 0.67 im Vergleich zum Pterin **14** mit einem R_f -Wert von 0.56. Im MS (EI) erscheint der Molpeak bei m/z 205 und unter Abspaltung eines Methylradikals ($M^{+•}-15$) erhält man das {[4-Oxo-3,4-dihydro-2-pteridiny)amino]methyliden}oxonium-Kation (m/z 190). Weiterhin findet man nach Abspaltung von Keten ($M^{+•}-42$) bei m/z 163 als Fragmentation das Pterin **14**. Verbindung **15** wurde in $[D_6]$ DMSO NMR-spektroskopisch vermessen. Im 1H -NMR-Spektrum wurde ein Singulett bei $\delta = 2.2$ den Protonen der Methylgruppe zugeordnet und die beiden Pyrazin-Protonen zeigten bei $\delta = 8.6$ und $\delta = 8.8$ jeweils ein Dublett (Schema 28). Bei Dieffenbacher^[34] und Mitarbeiter wurde die Substanz in deuterierter Trifluoressigsäure vermessen. Signale für NH-Protonen konnten unter den Meßbedingungen nicht beobachtet werden, denn sie werden gegen Deuterium ausgetauscht. Das Signal der Methylgruppe erscheint dort bei $\delta = 2.58$ und die Pyrazin-Protonen spalten nicht auf, sondern erscheinen als Singulett bei $\delta = 9.17$ (Schema 28).



Schema 28: ^1H -Verschiebungen von **15**, **VI** in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ und **15** (Literatur) in CF_3COOD

Laut Literatur liegt die Resonanz für die Absorption von Lactam-NH-Protonen der 2-Amino-4(3H)-pteridinone im Bereich von $\delta = 11$ -12, gemessen in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ^[34]. So findet man z.B. beim 2-(Dimethylamino)-4(3H)-pteridinon (**VI**, Schema 28) für das Lactam-Proton eine chemische Verschiebung von $\delta = 11.6$, so daß das Signal bei $\delta = 11.9$ ebenfalls dem Lactam-Proton der Verbindung **15** und $\delta = 12.3$ dem NH-Proton des Acetamids zugeordnet wurde.

Die erhaltenen ^{13}C -NMR-Daten wurden anhand von Berechnungen^[26] und durch Vergleich mit Daten der Referenzsubstanz **14** zugeordnet (Schema 29).



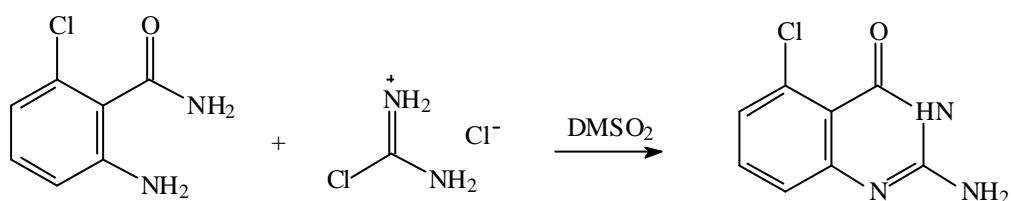
Schema 29: ^{13}C -Verschiebungen der Verbindung **15** und Referenz **14** (in CF_3COOD)

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von **15** zeigt statt der erwarteten acht Signale nur sieben. Mit Hilfe des DEPT-Spektrums können die chemischen Verschiebungen für C-6, C-7 und für das C-Atom der Methylgruppe zugeordnet werden. Sie stimmen mit den berechneten Daten bzw. mit denen der Referenzsubstanz **14** gut überein (Schema 29). Auch die Resonanzfrequenzen für die Kohlenstoffatome der Carbonylgruppen entsprechen den berechneten Frequenzen. Dem C-8a wird $\delta = 149.57$ zugeordnet, da in **V** ein ähnlicher Wert für das Kohlenstoffatom zu finden ist. In Verbindung **15** findet man im Spektrum für C-2 und C-4a die gleiche chemische Verschiebung ($\delta = 131.94$), was nicht abwegig erscheint, denn in den berechneten Daten liegen die chemischen Verschiebungen für die entsprechenden C-Atome eng beieinander.

Die sich nun anschließenden Versuche der Chlorierung von **15** zum *N*-(6,7-Dichlor-4-oxo-3,4-dihydro-2-pteridinyl)acetamid (**L**, Schema 26) zeigten nicht den gewünschten Erfolg. Dies ist

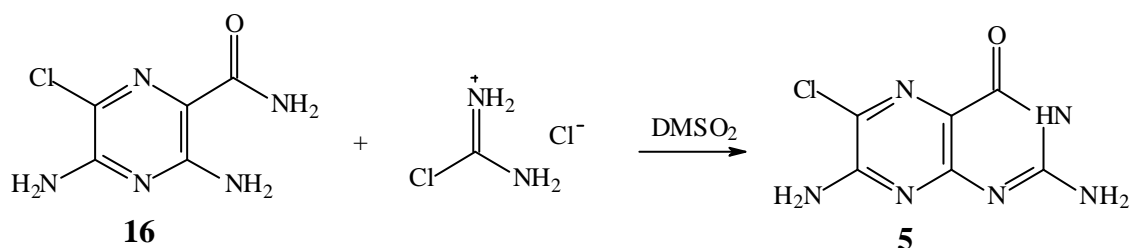
bedingt durch die sehr geringe Löslichkeit der Verbindung **15**. Die Umsetzung mit Sulfurylchlorid wurde in verschiedenen Lösungsmitteln wie Benzol, Chloroform, Dichlormethan und Eisessig durchgeführt, jedoch konnte bei jedem der Versuche nur das Edukt isoliert werden. Die direkte Umsetzung der Substanz in Sulfurylchlorid lieferte das gleiche Ergebnis, so daß an dieser Stelle die Synthese abgebrochen wurde.

Nach intensiver Literaturrecherche wurde eine andere Möglichkeit der Synthese in Betracht gezogen. Schneller und Ibay^[35] setzten 2-Amino-6-chlorbenzamid mit Chlorformamidinhydrochlorid um. Das Amid und das Hydrochlorid wurden zusammen mit Dimethylsulfon geschmolzen und als Produkt wurde das 2-Amino-5-chlor-4(3*H*)-quinazolinon erhalten (*Schema 30*).



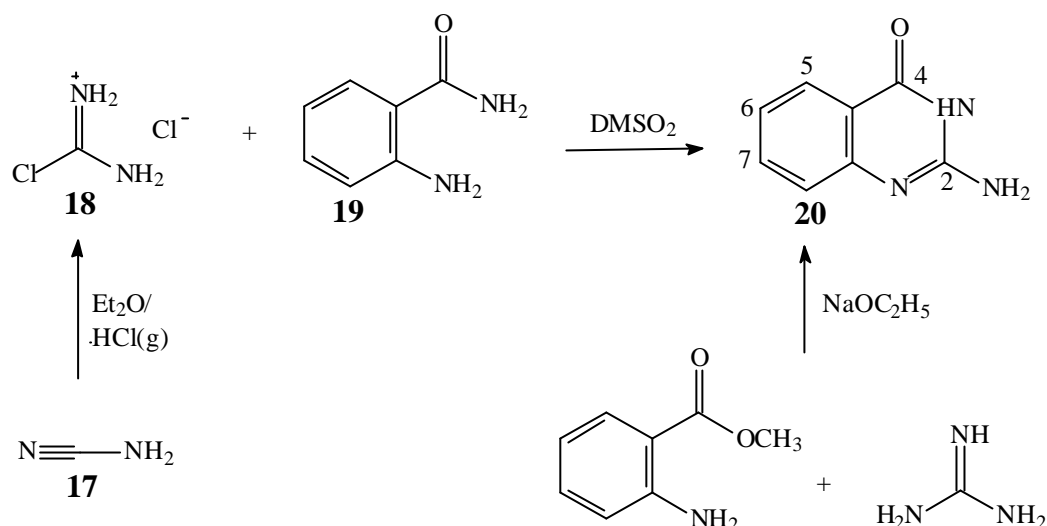
Schema 30

So sollte nun versucht werden, durch eine Schmelze von 3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxamid (**16**) mit Chlorformamidinhydrochlorid das Pteridinon **5** zu erhalten.



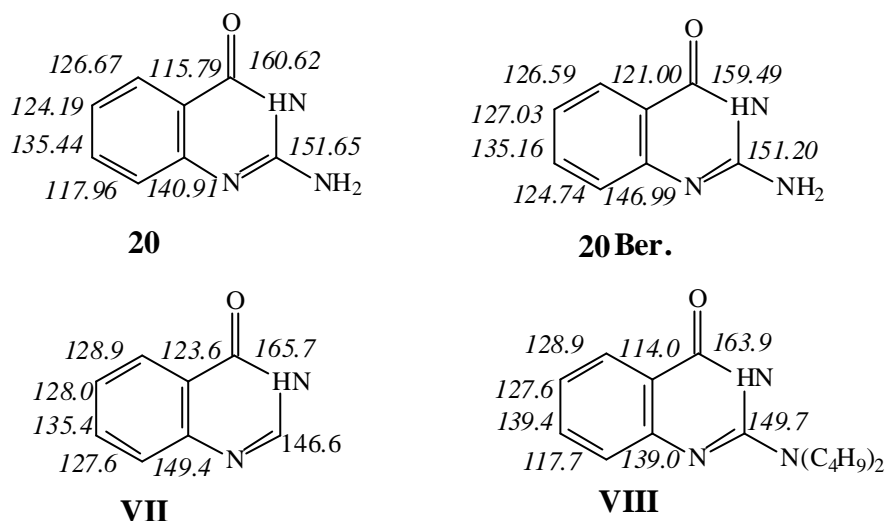
Schema 31: Synthesepplan 2 der Verbindung 5

Aus Kostengründen wurde die Reaktion zunächst mit 2-Aminobenzamid (**19**) als Modells substanz durchgeführt (*Schema 32*). Das Chlorformamidinhydrochlorid (**18**) muß für die Reaktion frisch hergestellt werden, indem Cyanamid (**17**) in Diethylether gelöst und anschließend HCl-Gas eingeleitet wird^[36]. Das durch die Umsetzung entstehende 2-Amino-4(3*H*)-quinazolinon (**20**) wird auch nach Hess und Mitarbeiter^[37] durch Reaktion von Methyl 2-aminobenzoat mit Guanidin erhalten (*Schema 32*).

Schema 32: Darstellung von **20**

Nach der Schmelze des Hydrochlorids **18** mit dem Anthranilamid (**19**) wurde das erwartete Produkt isoliert, das bei der Detektion mit UV-Licht bei 254 nm im FM 3 einen R_f -Wert von 0.5 aufzeigte. Im MS (EI) wurde für die Substanz **20** der Molpeak bei m/z 161 und ein weiterer intensiver Peak unter Abspaltung von Cyanamid bei m/z 119 erhalten.

Nach der D_2O -Zugabe erkennt man im ^1H -NMR-Spektrum sehr gut die Signale der aromatischen Protonen. Sie zeigen ein anderes Aufspaltungsmuster als bei Garratt beschrieben^[38]. So erscheinen bei $\delta = 7.92$ und $\delta = 7.23$ die Protonen der Position 5 bzw. 8 als Dublett und die Protonen der Position 6 und 7 als Triplet bei $\delta = 7.13$ und 7.58. Das acide NH-Proton des Amids ist als sehr breites Signal bei $\delta = 11.33$ und die Protonen der Aminogruppe als Singulett bei $\delta = 6.68$ zu erkennen. Wieder wurde die Zuordnung der Signale im ^{13}C -NMR durch Vergleich mit Referenzsubstanzen und Berechnungen getroffen (Schema 33).



Schema 33

Das DEPT-Spektrum zeigt vier tertiäre C-Atome. Die chemische Verschiebung des C-7 ($\delta = 135.44$) stimmt sowohl mit dem berechneten Wert als auch mit den bei den Referenzsubstanzen **VII** und **VIII** angegebenen Daten für C-7 überein. In den Verbindungen **VII** und **VIII** findet man δ (C-5) > (C-6) und so wird $\delta = 162.67$ dem C-5 und $\delta = 124.19$ dem C-6 zugeordnet. Das vierte Signal des C-8 erscheint bei $\delta = 117.96$ im DEPT-Spektrum. Für C-2 ($\delta = 151.65$), C-4 ($\delta = 160.62$) und C-8a ($\delta = 140.91$) findet man ähnliche Verschiebungen bei der Referenzsubstanzen als auch bei der berechneten Verbindung. Das Signal für C-4a bei $\delta = 115.79$ stimmt gut mit dem entsprechenden der Referenz **VIII** überein.

Nun wurde versucht, die Verbindung **16** mit Chlorformamidinhydrochlorid (**17**) und Dimethylsulfon in einer Schmelze zum Pteridinon **5** umzusetzen (Schema 31). Bei der dc Untersuchung im FM 3 findet man neben dem Edukt sechs Produkte. Ein Versuch der Trennung mittels FC wurde auf Grund der geringen Unterschiede ihrer R_f -Werte unterlassen. Ein Produkt zeigte jedoch den gleichen R_f -Wert wie die gewünschte Verbindung **5**.

3.2 Chlorhexidindihydrochlorid

3.2.1 Identitätsreaktion Chlorhexidindihydrochlorid

Zur Identitätsprüfung B^[6b] von Chlorhexidindihydrochlorid (**2** · **2 HCl**) werden nach der Ph. Eur. 2002 5 mg Substanz in 5 ml einer warmen Lösung von Cetrimid gelöst. Nach Zugabe von 1 ml konz. Natronlauge und 1 ml Bromwasser entsteht eine dunkelrot gefärbte Lösung.

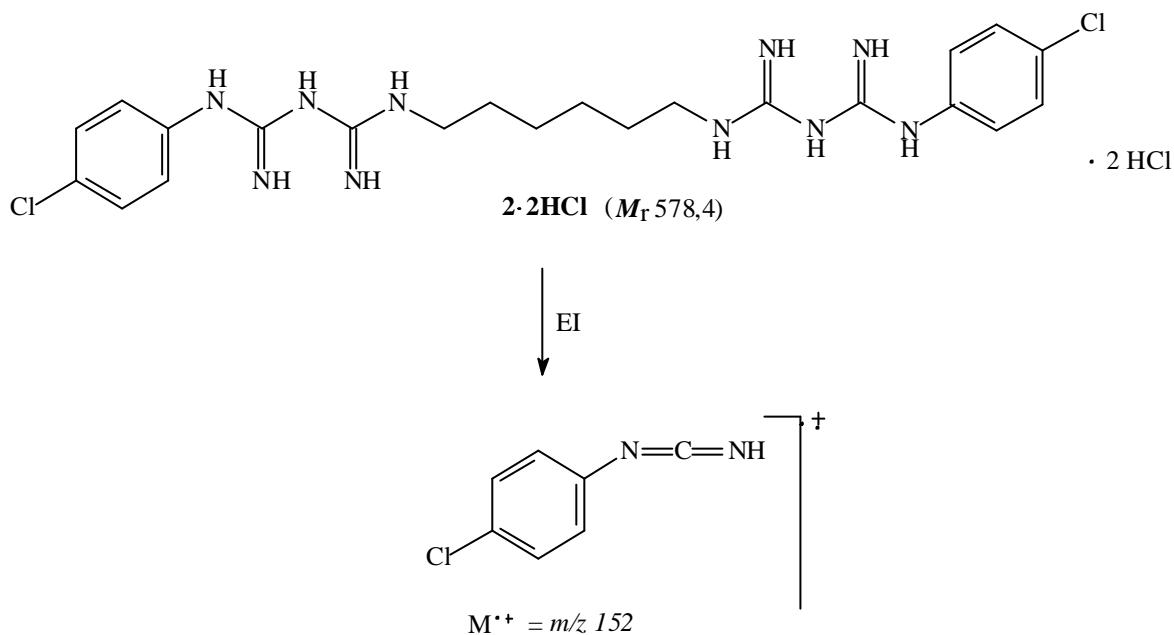
Es sollte versucht werden, das für die Farbreaktion verantwortliche Produkt zu identifizieren. Wie im Arzneibuchkommentar^[7] bei Chlorhexidindiacetat beschrieben, wurde unter Verzicht auf das Reagenz Cetrimid gearbeitet, indem die Substanz in methanolischer 2 M-KOH-Lösung gelöst und anschließend Bromwasser hinzugefügt wurde. Die dc Untersuchung (FM 2) der blutroten Lösung zeigte ein sehr komplexes Produktgemisch. Da sich die Produkte in ihren R_F-Werten nicht wesentlich unterschieden, wurde ein Trennungsversuch mittels FC unterlassen.

Nach Hilp^[39] kann bei Farbreaktionen zur Identitätsprüfung der Ph. Eur. auf dort verwendetes Bromwasser verzichtet werden, indem man es durch 1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin (DBH) ersetzt. So zeigt eine wässrige Lösung von Chlorhexidindihydrochlorid (**2** · **2 HCl**) (1 mmol) beim Versetzen mit einer alkalischen DBH-Lösung ebenfalls eine rote Färbung. Bei der dc Untersuchung dieser Lösung wurde im FM 2 anstatt eines komplexen Produktgemisches nur ein gelbgefärbter Fleck der Substanz mit einem R_F-Wert 0.72 gefunden. Es sollte versucht werden, diese Substanz zu isolieren.

Zunächst wurde die Reaktion in Abhängigkeit verschiedener DBH-Konzentrationen dc untersucht. Die Reaktion mit einem zehnfachen Überschuß an DBH schien die effektivste zu sein. Um die gelbgefärbte Substanz zu isolieren, wurden 0,2 g Chlorhexidindihydrochlorid (**2** · **2 HCl**) (0,35mmol) mit 1,0 g DBH (3,5mmol) umgesetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Einrotieren der organischen Phase und Waschen mit Diethylether wurde ein roter kristalliner Rückstand erhalten. Das ¹H-NMR zeigte jedoch deutlich, daß es sich bei der isolierten Verbindung ebenfalls um ein Produktgemisch handeln mußte. Im FM 5 wurden vier Produkte mit Hilfe der DC erkannt, die mittels FC in demselben Fließmittel getrennt werden sollten. Eine Trennung ist nicht gelungen, jedoch kristallisierte in den Fraktionen eine weiße Substanz in Nadeln aus. Der Schmelzpunkt dieser Substanz lag über 300 °C.

Eine NMR-spektroskopische Untersuchung war auf Grund der sehr schweren Löslichkeit nicht möglich. Das EI-Massenspektrum zeigte einen Basispeak (und Molpeak ?) bei m/z 463 und auf Grund des Isotopenmusters muß die Substanz weiterhin zwei Chloratome enthalten.

Das Edukt Chlorhexidindihydrochlorid ($2 \cdot 2 \text{ HCl}$) ist im EI instabil, so daß man nicht m/z 504 als Molpeak findet, sondern das *N*-(4-Chlorphenyl)carbodiimid bei m/z 152 (Schema 34). Die Anwendung einer schonenderen Methode (CI) lieferte das gleiche Ergebnis (m/z 170 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$).



Schema 34: Fragmentierung von Chlorhexidindihydrochlorid ($2 \cdot 2 \text{ HCl}$) im EI

Somit kann die Struktur nicht aufgeklärt werden. Es kann nur die Aussage getroffen werden, daß die weiße Substanz im MS eine höhere Stabilität im Vergleich zum Edukt $2 \cdot 2 \text{ HCl}$ besitzt.

3.2.1.1 Hinweise zum Reaktionsverlauf mit Hilfe von Proguanil

Um Hinweise zum Reaktionsverlauf der Farbreaktion zu bekommen wurde getestet, ob Proguanilhydrochlorid ($21 \cdot \text{HCl}$), ein Antimalariamittel, und Metforminhydrochlorid ($22 \cdot \text{HCl}$), ein orales Antidiabetikum, (Abb.6) ebenfalls mit Natriumhypobromit eine Rotfärbung ergeben. Die Reaktion wurde sowohl mit Bromwasser als auch mit DBH durchgeführt.

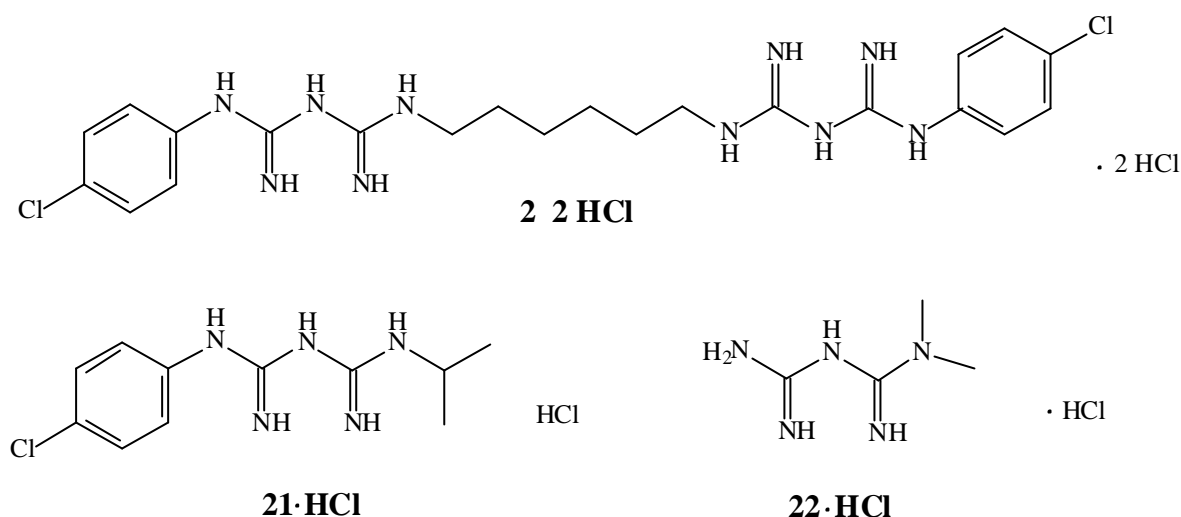


Abb. 6: Chlorhexidindihydrochlorid ($2 \cdot 2 \text{ HCl}$), Proguanilhydrochlorid ($21 \cdot \text{HCl}$) und Metforminhydrochlorid ($22 \cdot \text{HCl}$)

Die Struktur des Proguanilhydrochlorids ($21 \cdot \text{HCl}$) entspricht ungefähr der halben Chlorhexidinstruktur (**2**) (Abb. 6) und ergibt ebenfalls mit Hypobromit eine blutrote Farbe. Im Metforminhydrochlorid ($22 \cdot \text{HCl}$) ist nur noch die einfach substituierte Biguanidkette vorhanden (Abb. 6). Es zeigt keine Färbung mit dem Reagenz. Somit muß der Aromat mit seinem konjugierten π -Elektronensystem an der Rotfärbung beteiligt sein.

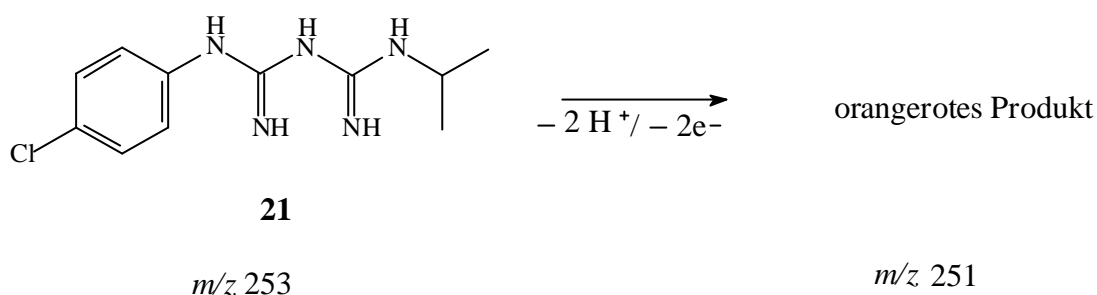
Die dc Untersuchung (FM 4) der Reaktionslösung des Proguanilhydrochlorids mit Bromwasser in Kalilauge zeigte einen gelben Fleck für das Hauptprodukt (R_f 0.5) und sechs Nebenprodukte. Es sollte versucht werden, das farbige Hauptprodukt zu extrahieren. Dazu wurden 120 mg Proguanilhydrochlorid in methanolischer KOH gelöst und anschließend mit einem vierfachen Überschuß an Bromwasser versetzt. Verwendete man bei der Aufarbeitung zum Ausschütteln Toluol als Lösungsmittel, so färbte sich dieses gelb, enthielt jedoch nur einen Teil der Nebenprodukte und nicht das Hauptprodukt. Bei der anschließenden Extraktion mit *t*-Butylmethylether enthielt die rot gefärbte organische Phase das gewünschte Hauptprodukt und in geringen Konzentrationen Nebenprodukte, die mit Hilfe der FC gut vom Hauptprodukt abgetrennt werden konnten.

Das Produkt ist in der Hitze instabil, denn nach dem Versuch der Umkristallisation in Petroläther zeigten sich bei der dc Untersuchung mehrere Produkte. Nach Lösen in Ethylacetat in der Kälte und Überschichten mit Petroläther kristallisierte die Substanz in roten Nadeln aus. Im FM 6 zeigt die Verbindung bei der dc Untersuchung einen R_f -Wert von 0.52.

Es mußte nun versucht werden, mit Hilfe von spektralen Daten die Struktur der Substanz aufzuklären.

Die orangefarbenen Nadeln schmelzen bei einer Temperatur von 120 °C und zeigen im UV-Spektrum ein Maximum bei 415 nm.

Im MS (EI) findet man den Molpeak bei m/z 251 und durch das Isotopenmuster wird deutlich, daß die Substanz weiterhin ein Chloratom enthalten muß. Somit stellt die Substanz ein Dehydrierungsprodukt von **21** dar (Schema 35), was durch die Elementaranalyse mit der Summenformel $C_{11}H_{14}ClN_5$ bestätigt wurde.



Schema 35

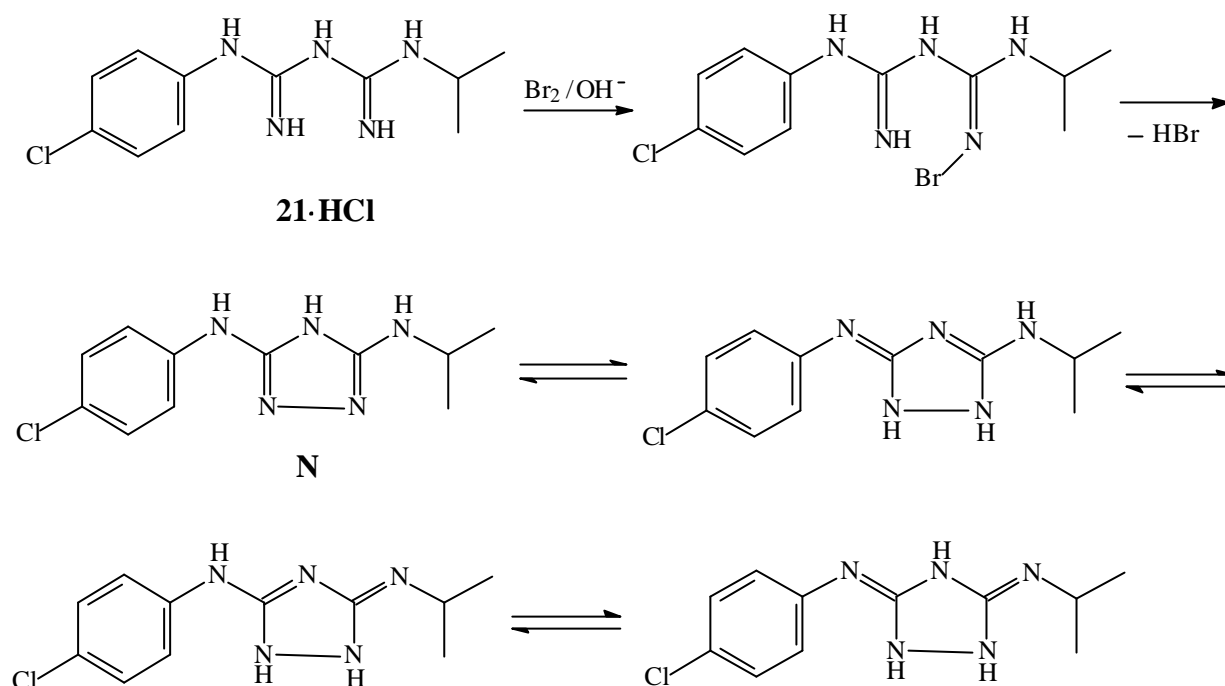
Betrachtet man das 1H -NMR-Spektrum ($CDCl_3$), so findet man bei $\delta = 7.92$ und $\delta = 7.41$ zwei Dubletts mit der Intensität von jeweils zwei Protonen, was weiterhin auf einen 1,4-disubstituierten Aromaten hinweist. Und im hohen Feld ist das für eine Isopropylgruppe typische Aufspaltungsmuster bei $\delta = 4.25$ (sept, CH, 1H) und 1.46 (d, CH_3 , 6H) zu sehen. Da der Aromat als auch die Isopropylgruppe im Farbprodukt weiterhin vorhanden sind, muß die Dehydrierung in der Biguanidkette erfolgt sein. NH-Signale sind nicht zu erkennen.

3.2.1.2. Theoretische cyclische Reaktionsprodukte

Für die Summenformel $C_{11}H_{14}ClN_5$ und dem Wissen, daß eine Dehydrierung in der Biguanidkette erfolgt sein muß, können verschiedene Produkte diskutiert werden, die im Folgenden vorgestellt werden.

Die Dehydrierung von **21** könnte über eine *N*-Bromverbindung verlaufen. Es erfolgt zunächst eine elektrophile Substitution eines Wasserstoffs durch ein Brom an einem der Stickstoffatome der Biguanidkette. Anschließend wird unter Ringschluß HBr eliminiert. Eine der Möglichkeiten wäre die

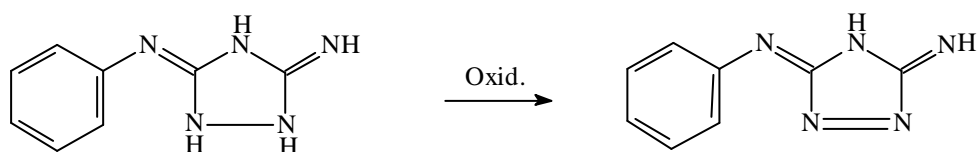
Cyclisierung zum N^3 -(4-Chlorphenyl)- N^5 -isopropyl-4*H*-1,2,4-triazol-3,5-diamin (**N**) (Schema 36), das in tautomeren Formen vorliegen kann.



Schema 36: Dehydrierung zum 1,2,4-Triazol **N**

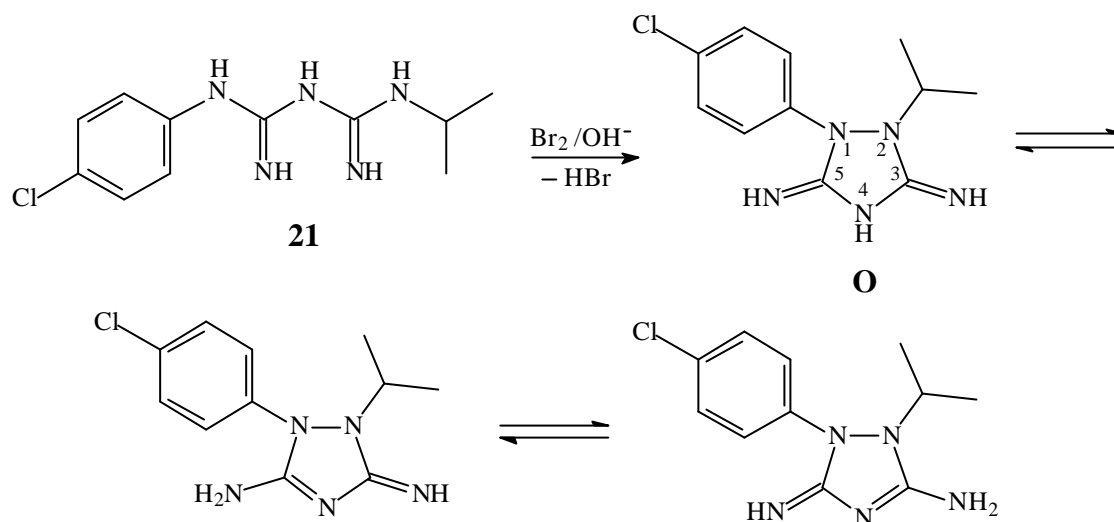
Curd und Mitarbeiter^[40] beschrieben das Triazol **N** (Schema 36) als eine farblose Substanz mit einem Schmelzpunkt bei 162-164°C. Somit kann es sich nicht um das rotgefärbte Produkt der Farbreaktion handeln.

Arndt^[41] oxidierte Triazole mit Kalimhexacyanoferrat in alkalischer Lösung zu farbigen cyclischen Azoverbindungen. So beschrieb er die Dehydrierung zum „ziegelroten“ *N*-[5-Imino-4,5-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-yliden]anilin (Schema 37). Theoretisch könnte das Proguanil (**21**) nach Ringschluß zum Triazol (Schema 36) durch Hypobromit ebenfalls zu einer cyclischen Azoverbindung weiter oxidiert werden. Die Struktur muß aber auf Grund der dann um zwei Wasserstoffatome abweichenden Summenformel ausgeschlossen werden.



Schema 37: Oxidation zur roten cyclischen Azoverbindung

Die Substitution eines Wasserstoffs durch Brom kann auch an dem Stickstoff des Isopropylamins in **21** erfolgen, so daß man einen Ringschluß zum 1,2-disubstituierten Guanazol-Derivat **O** erhält (Schema 38). Als Guanazole werden 3,5-Diimino-1,2,4-triazolidine bezeichnet^[43]. Auch hier können Tautomere formuliert werden (Schema 38).

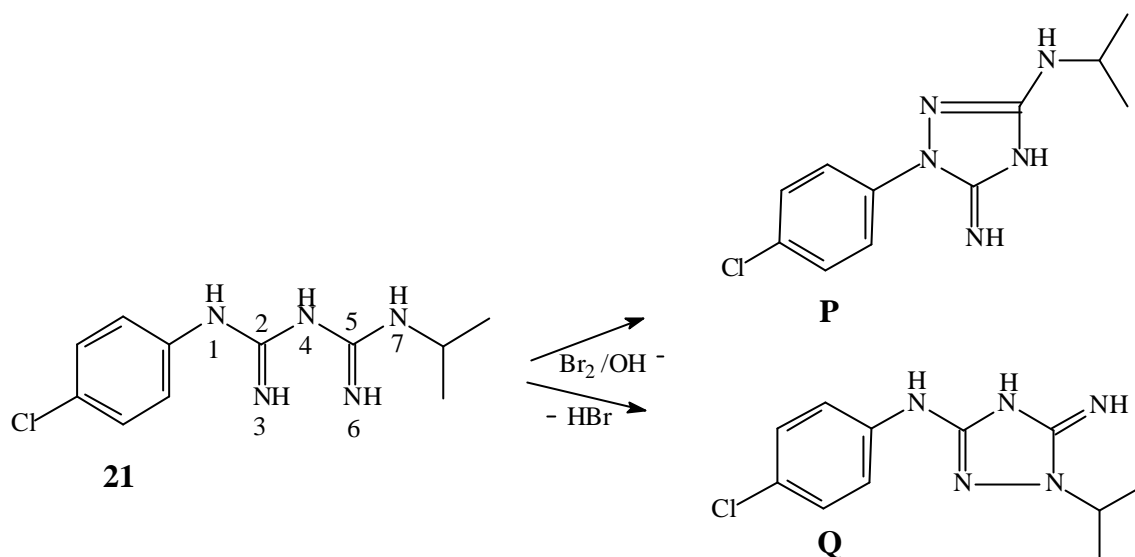


Schema 38 : Dehydrierung zum Guanazol **O**

Die isolierte rote Verbindung zeigt im UV-Spektrum ein Maximum bei 415 nm. Von Steck und Nachod^[42] untersuchte Guanazol-Derivate zeigten im Gegensatz dazu alle ein Maximum zwischen 200-300 nm. Ein Jahr später wurden weitere Guanazol Derivate ebenfalls als farblos beschrieben^[43]. Somit sind die formulierten Guanazol-Tautomere als Produkt der Farbreaktion ebenfalls auszuschließen.

Um die Möglichkeiten der Ringschlußbildung zu vervollständigen, werden zwei weitere Triazole formuliert (Schema 39).

Das Triazol **P** kann durch Ringschluß über die N-Atome 1 und 6 gebildet werden und das Triazol **Q** entsteht, indem der Ring über N-3 und N-6 geschlossen wird. Aber auch bei diesen Verbindungen ist das chromophore System für eine Rotfärbung nicht ausreichend, so daß sie als Produkte der Farbreaktion ausgeschlossen werden.



Schema 39 : mögliche Triazole **P** und **Q**

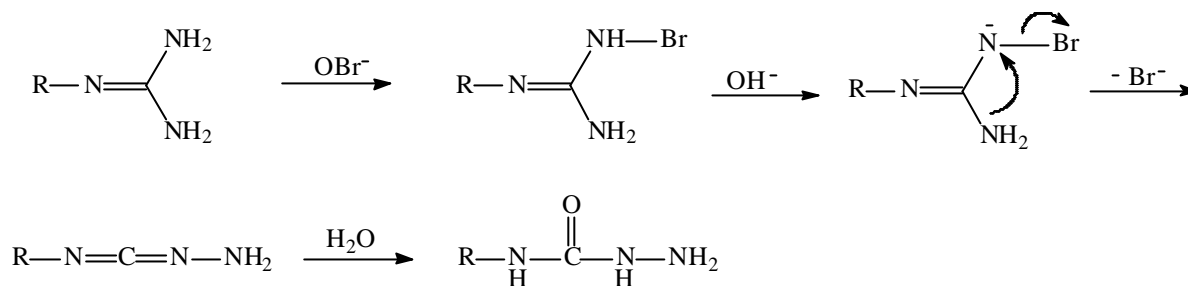
3.2.1.3 Theoretische offenkettige Reaktionsprodukte

Es ist nicht gelungen, ein cyclisches Produkt mit der Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ClN}_5$ zu formulieren, das ein ausreichendes chromophores System für eine Rotfärbung aufweist. Es könnte sich aber bei dem Farbprodukt um eine offenkettige Verbindung handeln.

Bei der Sakaguchi-Reaktion^[44] werden Guanidine mit Natriumhypochlorit bzw. Natriumhypobromit versetzt. Es erfolgt eine Umlagerung der Guanidine in ein Semicarbazid-System.

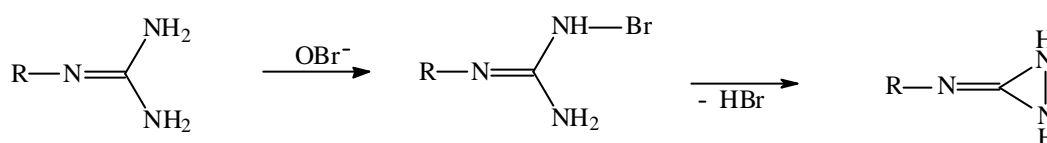
Im Proguanil (**21**) könnte ebenfalls mit Hypobromit eine ähnliche Umlagerung erfolgen. Betrachtet man jedoch den Mechanismus der Reaktion, wie bei Heesing und Hoppe^[44] beschrieben, so wird deutlich, daß die Reaktion streng spezifisch für monoalkylierte Guanidine und somit nicht für **21** anwendbar ist. Desweiteren kann es sich bei dem Produkt nicht um ein Semicarbazid handeln, da die Verbindung laut Elementaranalyse keinen Sauerstoff besitzt.

Der Mechanismus^[44] wird über die Bildung eines *N*-Bromguanidins erklärt mit anschließender α -Eliminierung von HBr (Schema 40). Es löst sich eine Aminogruppe vom Kohlenstoff und tritt an den Stickstoff des intermediär entstehenden Anions der *N*-Bromverbindung unter gleichzeitiger Abspaltung des Bromid-Ions. So wird zunächst ein Aminocarbodiimid erhalten, das in wässriger Lösung zum Semicarbazid hydrolysiert (Schema 40).

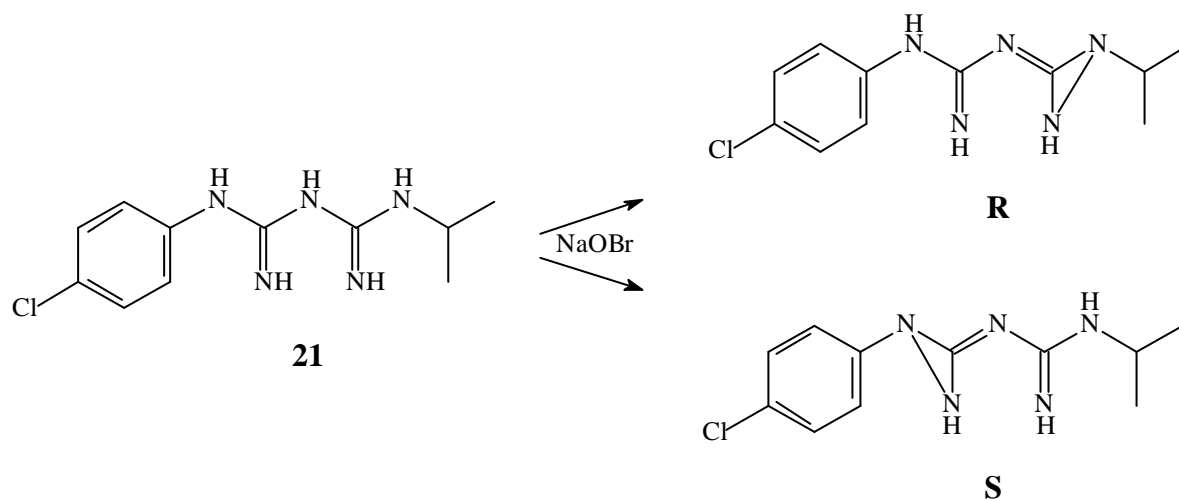


Schema 40: Mechanismus der Sakaguchi-Reaktion

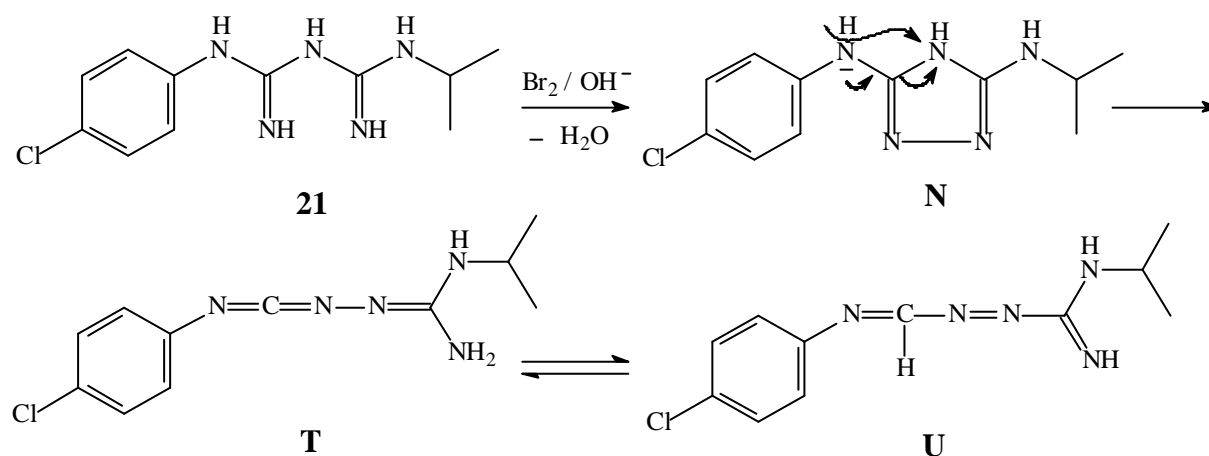
Beim Mechanismus wird nach Bildung des N -Bromguanidins anstatt der α -Eliminierung eine γ -Eliminierung von HBr zum Diaziridinimin-Derivat diskutiert (Schema 41). Es ist jedoch bekannt, daß eine Ringöffnung nur bei Säurekatalyse zu erwarten ist und somit bei der Sakaguchi-Reaktion auszuschließen ist.

Schema 41: γ -Eliminierung zum Diaziridinimin

Theoretisch können für die Reaktion von Proguanil (**21**) mit Hypobromit ebenfalls Diaziridinimine formuliert werden (Schema 39), die aber auf Grund einer hohen Ringspannung instabil sein dürften. Auch das chromophore System ist für eine Rotfärbung nicht ausreichend, so daß diese Strukturen ebenfalls für die Farbreaktion auszuschließen sind.

Schema 42: Bildung von Diaziridinimin **R** und **S**

Um ausgehend von **21** eine offenkettige, farbige Verbindung zu erhalten, müßte man in der Seitenkette eine Azogruppe formulieren. Das wiederum ist nur durch eine Umlagerung möglich. Es wäre denkbar, daß zunächst Cyclisierung zum Triazol **N** eintritt (*Schema 43*) und sich anschließend dieser Ring unter Bildung eines Carbodiimids **T** (*Schema 43*) wieder öffnet. Die Verbindung **T** würde über ein ausreichendes Chromophor verfügen. Das IR-Spektrum der zu untersuchenden Substanz zeigt jedoch nicht die für Carbodiimide typischen intensiven Banden^[45] bei 2155-2130 cm⁻¹. Das Tautomer **U** (*Schema 43*) würde statt der Carbodiimid- eine Methanimin-Struktur aufweisen. Aber auch diese Verbindung muß ausgeschlossen werden, denn im ¹H-NMR ist kein Signal für das Proton der CH-Gruppe zu erkennen und das ¹³C-NMR zeigt im DEPT-Spektrum nur das Methin-Signal der Isopropylgruppe.



*Schema 43: Offenkettige Diazoverbindungen **T** und **U***

3.2.1.4 Strukturaufklärung mit Hilfe der ESI-MS

Es war nicht gelungen, mit dem aus dem EI-MS erhaltenen Molpeak (m/z 251) (Abb.7) und den weiteren Informationen aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren eine Struktur zu formulieren, die zu einem rot gefärbten Produkt paßt.

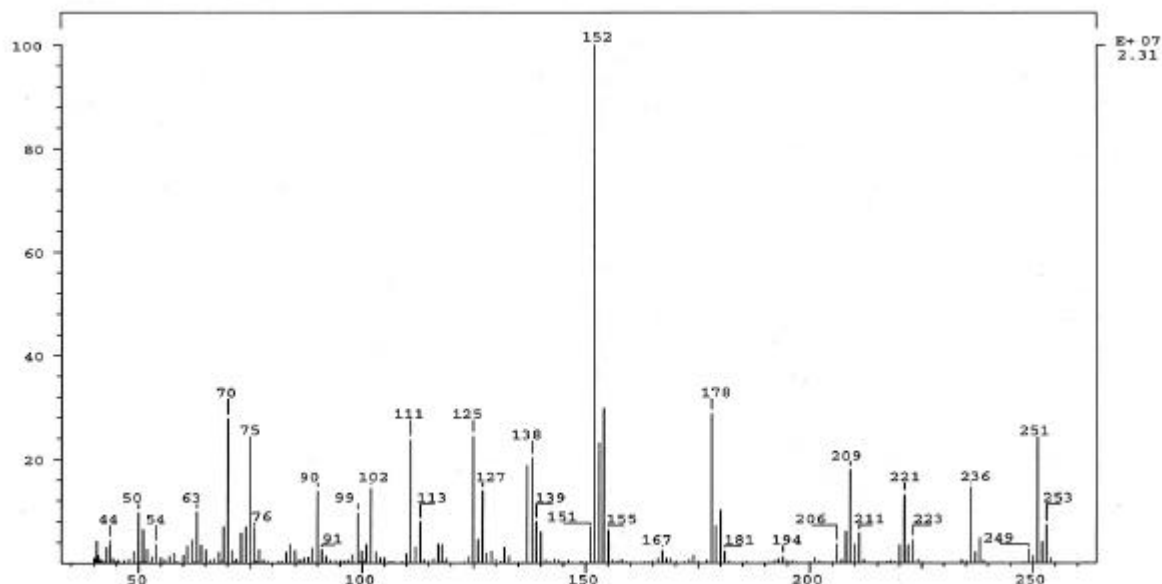


Abb. 7: EI-MS der roten Substanz

Mit der Anwendung eines schonenderen Ionisierungs-Verfahren sollte die Molmasse nochmals überprüft werden. Die Substanz wurde dazu mit der ESI-MS vermessen.

Das Ergebnis der Messung war erstaunlich, denn das ESI zeigte ein um zwei Masseneinheiten geringeres Ion gegenüber der im EI erhaltenen Masse. Im negativen Ionenmodus wurde $[\text{M}-\text{H}]^- = m/z$ 248 (vgl. Abb.8,oben) und im positiven Ionenmodus $[\text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ 272 bzw. $[2 \times \text{M} + \text{Na}]^+ = m/z$ 521 (vgl. Abb. 8, unten) gemessen. Deutlich sind weiterhin die Isotopenpeaks für Chlor zu erkennen. Das bedeutet, dass unter EI-Bedingungen eine Hydrierung des Produktes eingetreten sein muß. Die Bildung der hydrierten Form während der Messung kann durch katalytische Hydrierung an den nickelhaltigen Stahloberflächen der Ionen-Quelle mit Wasser als Wasserstoffdonor erklärt werden. Dieses Phänomen der Hydrierung wurde von Dobrev^[46] ebenfalls beobachtet. Ein hochaufgelöstes ESI-MS bewies die Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$.

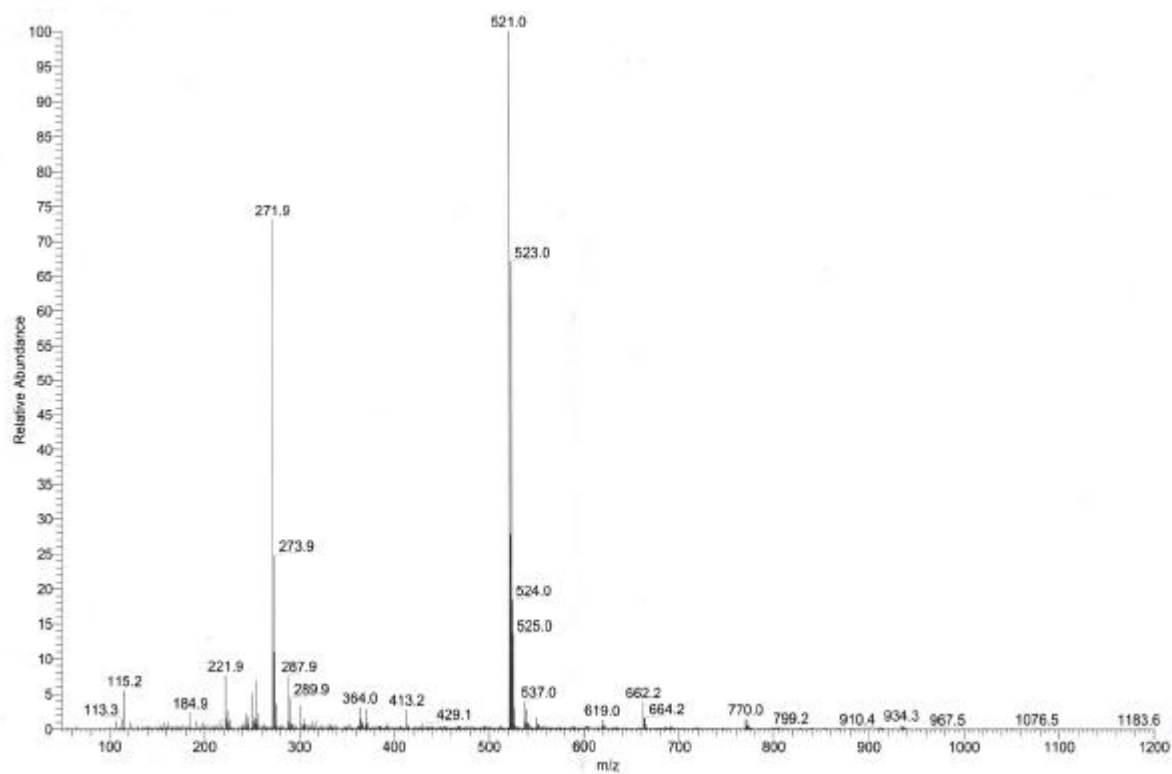
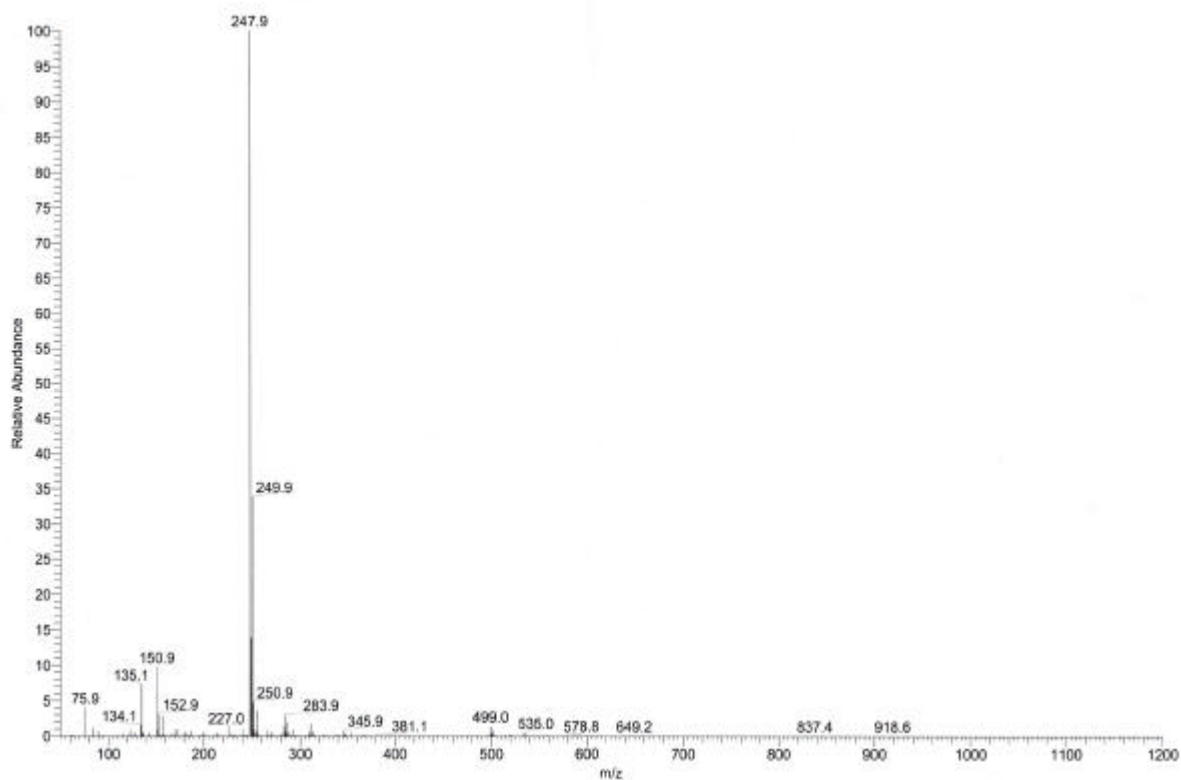
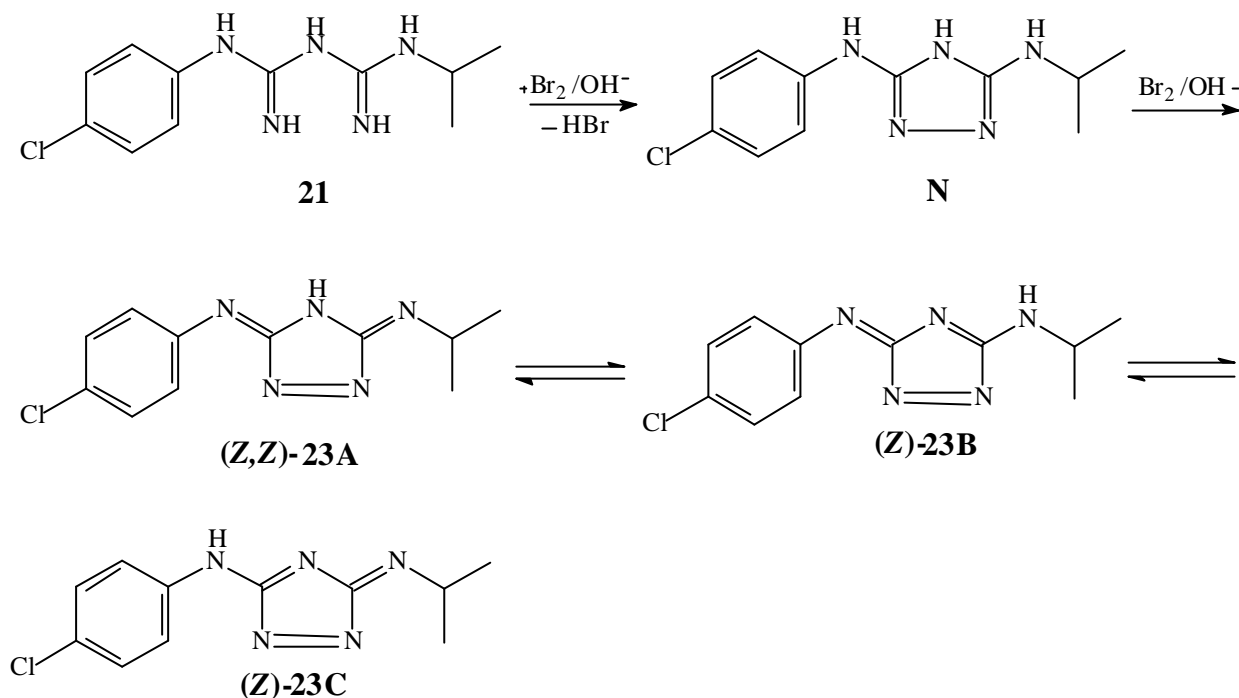


Abb 8: ESI-MS-Spektren der roten Verbindung

Mit der Molmasse von $M_r = 249$ kann nun als Farbprodukt eine cyclische Azoverbindung formuliert werden, wie sie im vorherigen Kapitel bereits angedacht wurde. Im ersten Schritt erfolgt mit dem Edukt **21** Ringschluß zum farblosen Triazol **N**. Anschließend wird mit Hypobromit zum 4-Chlor-*N*-(5-[[1-methylethyl]imino]-4,5-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-yliden)anilin (**23A**) bzw. deren Tautomere 3-[(4-Chlorphenyl)imino]-*N*-isopropyl-3*H*-1,2,4-triazol-5-amin (**23B**) und *N*-(4-Chlorphenyl)-3-[[1-methylethyl]imino-3*H*-1,2,4-triazol-5-amino (**23C**) oder deren (*E*)-Isomere dehydriert (Schema 44).

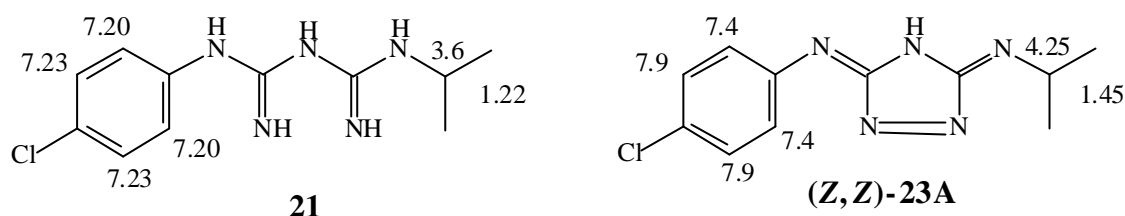


Schema 44: Reaktion zum Farbprodukt **23**

Das chromophore System des Produktes **23** ist für eine Rotfärbung ausreichend. Vergleicht man außerdem **23A** mit dem von Arndt^[41] beschriebenen rotgefärbten *N*-[5-Imino-4,5-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-yliden]anilin (Schema 37), so findet man lediglich Unterschiede in den Substituenten der Positionen 3 und 5 des Triazols. Auch die von Arndt und Tschenschner^[47] beschriebenen sauren statt basischen Eigenschaften dieser cyclischen Azoverbindungen stimmen mit der isolierten Verbindung **23A** gut überein. Die roten Kristalle lösen sich mit tieferer Farbe in Alkalilauge. Einen weiteren Beweis für die vorliegende Struktur **23A** erhält man über Vergleich der Daten des ¹H-NMR Spektrums (CDCl₃) mit jenem von Proguanil (**21**) (Schema 45). Im Aromaten als auch in der Isopropylgruppe erfahren die Protonen in dem Farbprodukt eine deutliche Tieffeldverschiebung. Das

ist gut mit den nun vorliegenden Iminstrukturen zu erklären, wodurch der Elektronendonator-Effekt der Stickstoffatome aufgehoben wird.

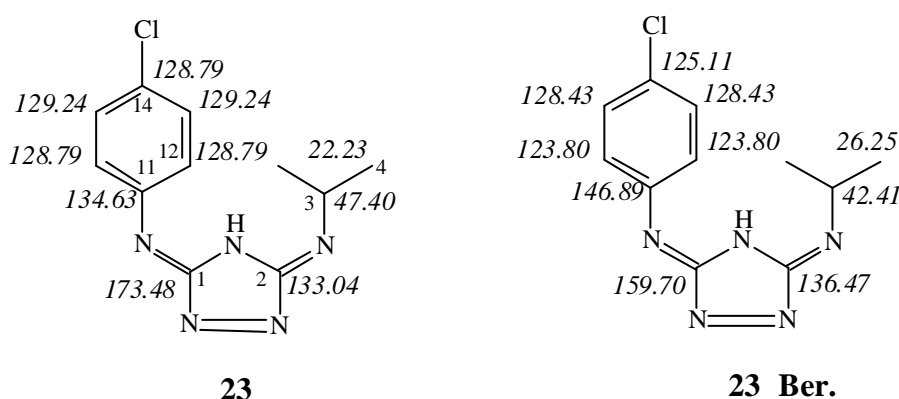
Die Daten des ^1H -NMR-Spektrums als auch die NH-aciden Eigenschaften der Verbindung deuten darauf hin, daß die Verbindung eher in der Struktur **23A** als in der tautomeren Form **23B** oder **23C** vorliegt.



Schema 45: ^1H -NMR-Verschiebungen von Proguanil (**21**) und Farbprodukt **23A**

Das ^{13}C -NMR von **23** zeigt sieben Signale, wobei die Zuordnung der Isopropylgruppe und der aromatischen Protonen durch das DEPT-Spektrum eindeutig ist. Die weiteren Signale wurden durch Vergleich mit berechneten ^{13}C -Daten^[26] für die Substanz zugeordnet (Schema 46).

Der Wert der größten chemischen Verschiebung wurde dem C-1 zugeordnet ($\delta = 173.48$). Da das Signal für C-14, laut Berechnung, eine ähnliche chemische Verschiebung wie C-12 und C-16 aufweist, wird davon ausgegangen, daß das Signal durch eine Überlagerung im Spektrum nicht sichtbar ist. Die verbleibenden Signale werden C-11 und C-2 zugeordnet, wobei laut Berechnung $\delta \text{ C-11} > \delta \text{ C-2}$ ist (Schema 46).



Schema 46: gefundene und berechnete ^{13}C -NMR-Daten der Verbindung (E,E)-**23**
(Lokanten wie in Abb. 9)

Es wurden Einkristalle gezüchtet (Ethylacetat/Petroläther), um eine Röntgenstrukturanalyse zur Absicherung der Struktur durchzuführen. Sie beweist, daß bei der Reaktion von Proguanil (**21**) mit Hypobromit die cyclische Azoverbindung entsteht. Im Kristall liegt die Verbindung als (*E*)-3-[(4-Chlorphenyl)imino]-*N*-isopropyl-3*H*-1,2,4-triazol-5-amin (**23B**) vor (Abb. 9).

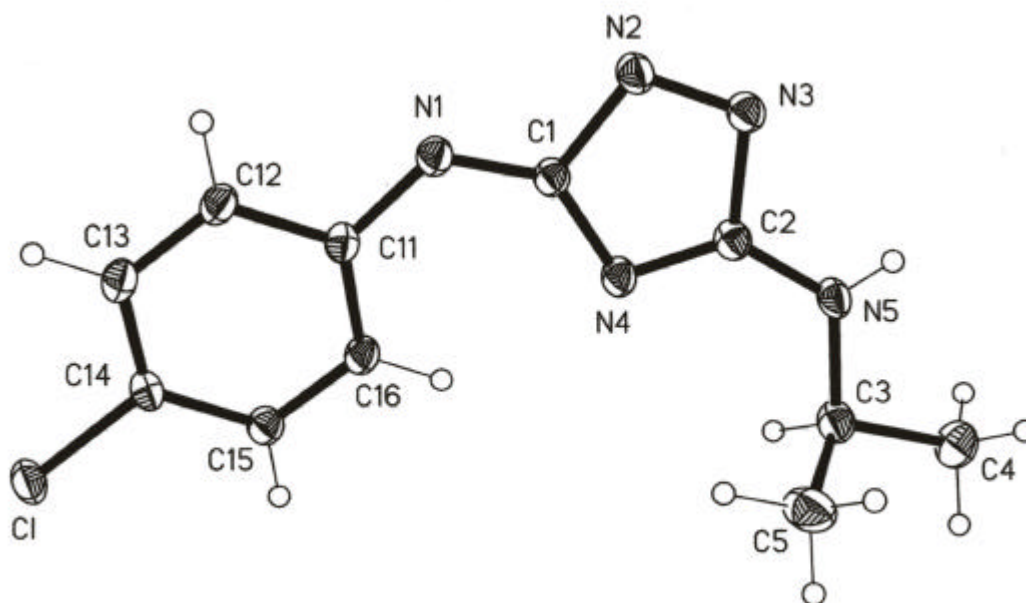


Abb. 9: Röntgenstrukturanalyse des Farbproduktes (*E*)-**23B**

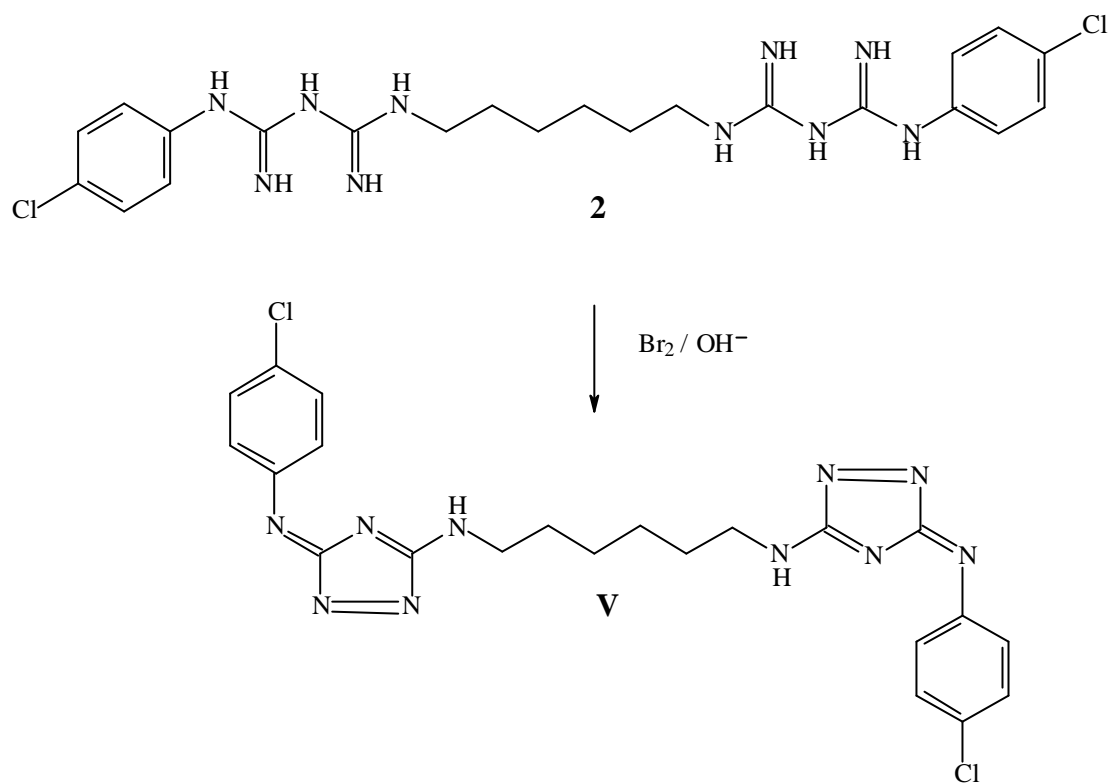
Da **23B** im Kristall in der (*E*)-Form vorliegt, ist es sehr wahrscheinlich, daß in Lösung **23A** (*E,E*)-Konfiguration besitzt..

3.2.1.5 Ableitung des Farbproduktes von Chlorhexidin

Die Reaktion von Proguanil (**21**) mit Hypobromit wurde untersucht, um Hinweise über die Farbreaktion des Chlorhexidins (**2**) mit Hypobromit zu erhalten. Es wurde noch einmal versucht, ein Produkt der Chlorhexidinfarbreaktion zu isolieren, indem bei der Aufarbeitung ähnlich wie beim Proguanil verfahren wurde. Der Versuch scheiterte jedoch wieder an der Trennung des Produktgemisches.

Es wird vermutet, daß beim Chlorhexidin (**2**) die gleichen Reaktionen wie beim Proguanil ablaufen. In beiden Biguanidketten kann ebenfalls zunächst Dehydrierung eintreten mit anschließender

Oxidation zum N^1,N^6 -Bis{3-[(4-Chlorphenyl)imino]-3H-1,2,4-triazol-5-yl}-1,6-hexandiamin (**V**) (Schema 47). Daneben kann auch einfache Cyclisierung erfolgt sein, können geometrische Isomere vorliegen und/oder zusätzliche Dehydrierung in der 1,6-Hexandiamin-Kette eingetreten sein.



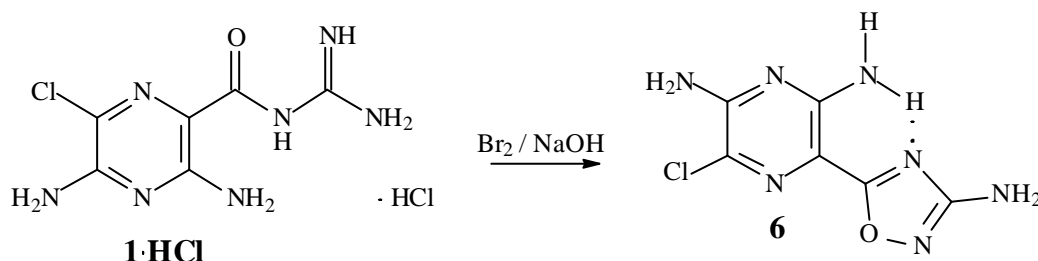
Schema 47: Theoretisches Produkt **V** der Farbreaktion von Chlorhexidin (**2**)

4 Zusammenfassung

Farbreaktion zur Identifizierung von Amiloridhydrochlorid

Die Pharmacopoea Europaea (Ph. Eur.) 2002 läßt zur Prüfung des diuretisch wirksamen Amiloridhydrochlorids (**1** · HCl) auf Identität neben physikalisch-chemischen Methoden auch eine Farbreaktion durchführen. Dazu wird **1** · HCl mit Cetrimid-Lösung, Natronlauge und Bromwasser bei Raumtemperatur umgesetzt. Die grünlichgelbe Färbung der erhaltenen Lösung schlägt auf Zusatz von Salzsäure nach Dunkelgelb um. Dies ist mit einer starken blauen Fluoreszenz verbunden, die durch ultraviolettes Licht der Wellenlänge von 365 nm angeregt wird. Die Struktur des für die Farbreaktion verantwortlichen Produkts war bislang unbekannt. Weder in der Monographie in Florey^[8] noch im Kommentar zur Pharmacopoea Europaea^[7] finden sich Hinweise auf die chemischen Vorgänge bei dieser Identitätsprüfung.

Das gelbbraune Farbprodukt wurde in 1%iger Ausbeute isoliert. Durch Vergleich von Massenspektren sowie ¹H- und ¹³C-NMR-Daten mit ausgewählten Referenzsubstanzen konnte auf die Verbindung **6** (Abb. 10) geschlossen werden. Die Struktur wurde durch eine

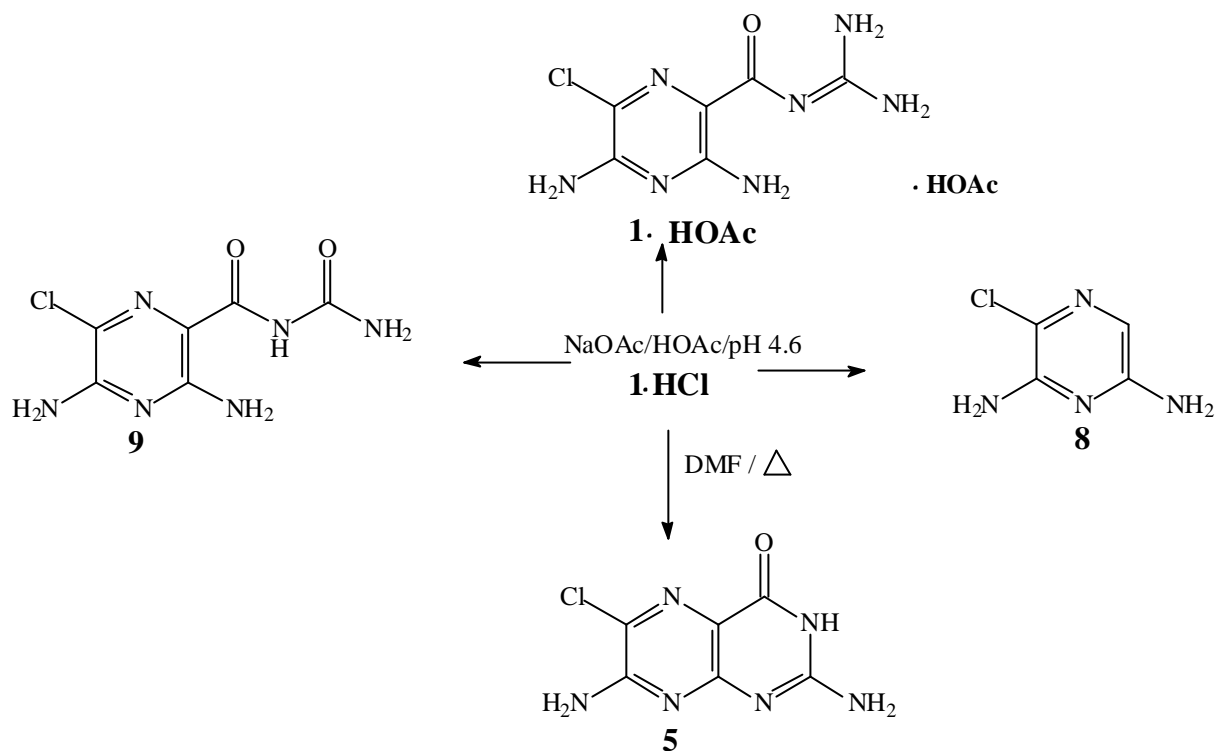


Röntgenstrukturanalyse abgesichert.

Abb. 10: Farbstoff der Identitätsreaktion von **1** · HCl

Nach Mazzo^[8] entstehen aus Amiloridhydrochlorid bei unterschiedlichen pH-Werten in wässriger Lösung bei erhöhten Temperaturen drei Zersetzungsprodukte. Bei pH 4-5 soll Amilorid zu einem Pteridinon **5** cyclisieren. Spektroskopische und analytische Daten lagen für **5** nicht vor. Beim Erhitzen von Amiloridhydrochlorid in einem Acetatpuffer pH 4.6 wurde nicht das Cyclisierungsprodukt **5**, sondern schwerlösliches Amiloridacetat (**1** · HOAc) neben den Abbauprodukten **8** und **9** erhalten (Schema 48). Zur gezielten Darstellung des Pteridinons **5**, wurde Amiloridhydrochlorid in DMF

unter Rückfluß erhitzt. Dabei erfolgte thermische Cyclisierung zum gewünschten Produkt **5** (Schema 48). Die Struktur wurde durch Vergleich von ^{13}C -NMR-Daten mit ausgewählten Referenzsubstanzen abgesichert.



Schema 48: Darstellung des Pteridinon **5**

Farbreaktion zur Identifizierung von Chlorhexidindihydrochlorid und Proguanilhydrochlorid

Zur Identitätsprüfung des Desinfektionsmittels Chlorhexidindihydrochlorid (**2 · 2 HCl**) wird nach der Ph. Eur. 2002 die Substanz in einer warmen Lösung von Cetrimid gelöst. Es werden konz. Natronlauge und Bromwasser hinzugegeben und es entsteht eine dunkelrote Färbung. Laut Kommentar des Arzneibuches^[8] ist auch hier der Reaktionsmechanismus unbekannt.

Da es nicht gelungen ist, das aus der Reaktion erhaltene Produktgemisch chromatographisch zu trennen, wurde die Reaktion mit dem Antimalariamittel Proguanil (**21**), das der halben Chlorhexidinstruktur entspricht, durchgeführt. Für das in 4%iger Ausbeute isolierte rote Farbprodukt konnte zunächst für die aus dem EI-MS erhaltenen Molmasse keine Struktur formuliert werden. Erst nachdem im ESI-MS ein um zwei Masseneinheiten geringeres Ion erhalten wurde, konnte das

Farbprodukt **23A** formuliert werden. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse wurde bewiesen, daß im Kristall die tautomere Form **23B** vorliegt.

Daraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß beim Chlorhexidin (**2**) die gleichen Reaktionen ablaufen und sich unter den Produkten der Identitätsreaktion auch die Substanz **V** befindet.

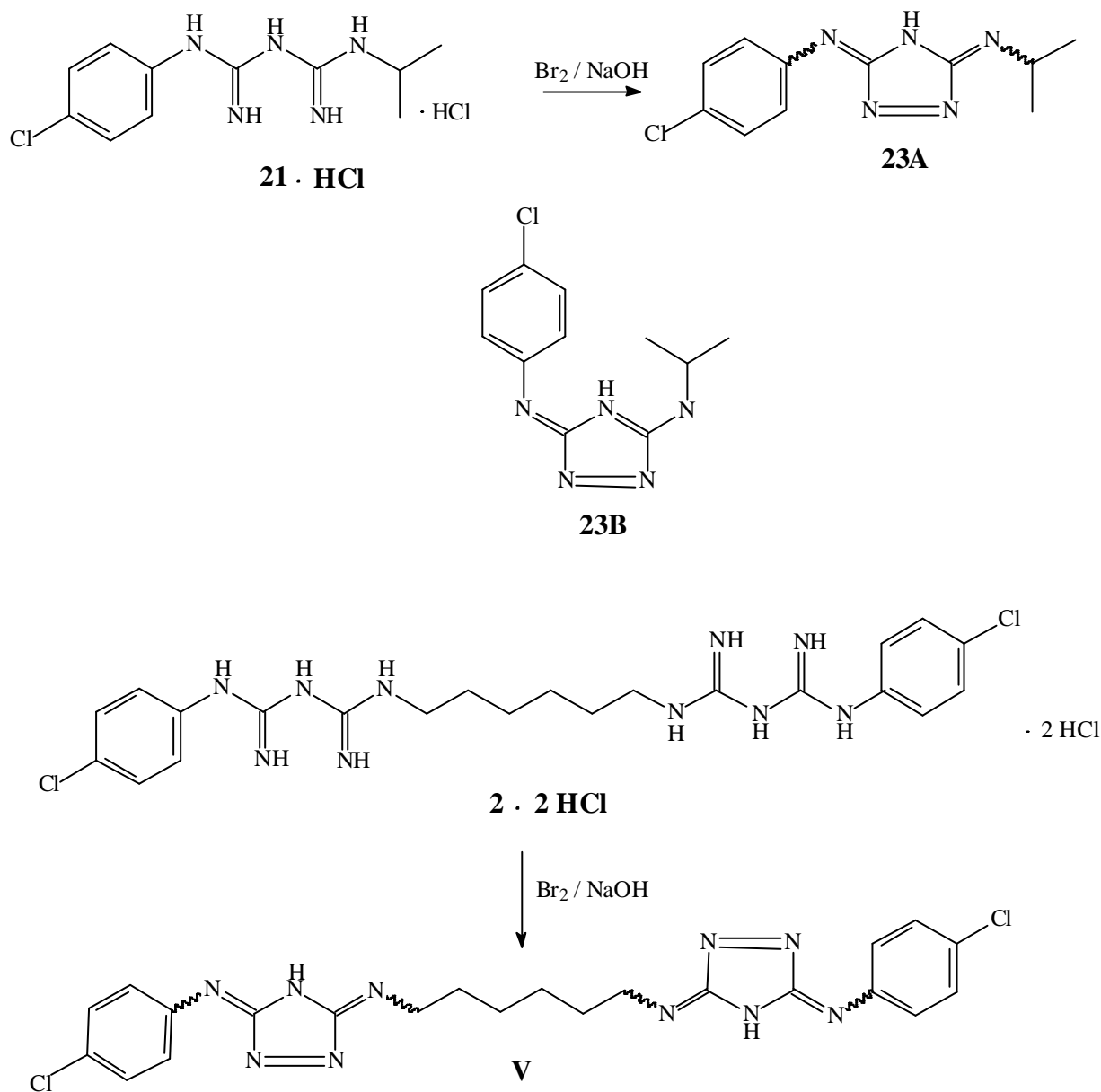


Abb. 11

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Angaben

Schmelzpunkte:

(1) = Kofler-Heiztischmikroskop, nicht korrigiert

(2) = Büchi SMP 20 (Fa. Büchi Laboratoriumstechnik AG, CH-Flawil/Schweiz), nicht korrigiert

Elementaranalysen:

C-H-N-O Elemental Analyzer 1106, Carlo Erba und CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest

IR-Spektroskopie (IR):

ATI Mattson Genesis Series FT-IR-Spektrometer

UV-Spektren (UV):

Philipps PU 8730 UV/VIS-Spektrophotometer

Fluorimeter:

Kontron SFM 25

Massenspektrometrie (MS):

Finnigan-MAT 8400-MSS I und Finnigan MAT 90 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig)

Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV

Chemische Ionisation (CI)-MS: Reaktandgas NH₃

Elektrospray Ionisation (ESI)-MS

Kernresonanzspektren (NMR)

^1H -NMR (400.13 MHz) und ^{13}C -NMR (100.61 MHz) (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig):

Bruker AM-400 und Bruker Avance DRX-400 einschließlich der DEPT-Messungen.

Ein- und zweidimensionale NMR-Spektren (Institut für Pharmazeutische Chemie und Pharmazeutische Technologie der Karl-Franzens-Universität Graz):

^1H -NMR (399.98 MHz), ^{13}C -NMR (100.5 MHz) Varian 400 MHz Unity Inova Spektrometer mit inversem 5 mm Breitbandprobenkopf und Gradienteneinheit.

Für die Durchführung der gs -HMBC- und 1D-NOE-Differenz Experimente wurden die Standard-Pulsprogramme verwendet. Die einzelnen gs -HMBC-Experimente wurden jeweils mit einem Delay von 125, 83, 63, 50, 42, 31 und 25 ms für $^nJ_{\text{CH}} = 4, 6, 8, 10, 12, 16$ und 20 Hz optimiert. Für die NOE-Messungen wurden die Proben entgast und T_1 -Bestimmungen durchgeführt.

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm nach der d_{TMS} -Skala angegeben. Für die Multiplizität der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, sept = Septett

Analytische Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC):

LiChrograph[®] L-6200 Gradientenpumpe, LiChrograph[®] L-4750 Dioden-Array-Detektor, LiChroCART[®] Auto-fix, PC 486 DX, D 6500 DAD System Manager Software

Trennsäule: LiChroCart[®] 125-4, LiChrosper[®] 100 RP-18 (5 μm), Vorsäule LiChroCart[®] 4-4, Select B; Flussrate 1.000 ml/min; isokratisch; Injektionsvolumen: 20 μl ; Detektion (DAD): 254 nm; Nettoretentionszeit (t_{r}) in min; Totzeit (t_{m}) in min bestimmt mit Thiohamstoff

Methode (1): $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (80:20); $t_{\text{m}} = 1.33$

Methode (2): Puffer pH 2.3/ MeCN (80:20); $t_{\text{m}} = 1.39$

Methode (3): $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (20:80); $t_{\text{m}} = 1.00$

Puffer pH 2.3 = 6.66g KH_2PO_4 + 2.8 ml H_3PO_4 ad 1000.0 ml Wasser

Flash-Chromatographie (FC):

Kieselgel 60 (FA. Merck)

Eluent: Petroläther/EtOAc (2:1)

Dünnschicht-Chromatographie (DC):

DC-Platten: Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄-Fertigfolien für die DC, 40 x 80 mm (Mascherey-Nagel)

Fließmittel(FM): *FMI:* H₂O/Dioxan/NH₃ (8 : 0.8 : 0.05)

FM 2: CHCl₃/MeOH (9 : 1)

FM 3: Toluol/HOAc/MeOH/Aceton (4 : 2 : 2 : 2)

FM 4: Heptan/THF/MeOH/H₂O (15 : 10 : 1 : 0.5)

FM 5: CHCl₃/MeOH (9 : 0,5)

FM 6: Petroläther/EtOAc (2 : 1)

Software:

WORD 97 (FA. MICROSOFT), CHEMWINDOW 6.0 (FA. BIO RAD LABORATORIES)

5.2 Danksagungen

Für die kostenlose Überlassung der Arzneistoffe Proguanilhydrochlorid (Paludrine[®]) und Metformin danke ich AstraZeneca und AZUPHARMA.

Den Mitarbeitern der Analytischen Abteilung des Institutes für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen, die Aufnahme der FT-IR-, UV- und Fluoreszenz-Spektren, sowie für die Probenvorbereitung der NMR-Experimente.

Herrn *Prof. Jones*, Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig, danke ich für die Anfertigung der Röntgenkristallstrukturanalysen.

Frau *P. Holba-Schulz*, NMR-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig, danke ich für die Aufnahme und Bearbeitung der NMR-Experimente.

Frau *D. Döring*, Herrn *Dr. U. Papke*, Massenspektrometrie-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig, danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Bei den Herren *Basu*, *Hartmann*, *Reinhold* und *Roese* bedanke ich mich für die stetige und prompte Versorgung mit Chemikalien, Glasgeräten und technischen Geräten.

Meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Frau *Ulrike Voigt* und Herrn *Frank Höljes* danke ich für die motivierte Mitarbeit.

Dank auch an Herrn *Dr. M. Lorke* für die wertvolle Unterstützung in Computerfragen.

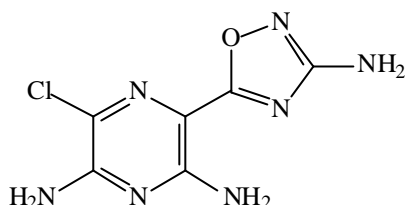
Herrn *Dr. L. Preu* möchte ich für sein initiatives Engagement hinsichtlich Datenbankrecherche und NMR-Simulationen danken.

5.3 Verbindungsverzeichnis zum experimentellen Teil

2-Amino-4(3 <i>H</i>) chinazolinon (20) _____	80
<i>N</i> -[(3-Amino-6-chlor-5-hydroxy-2-pyrazinyl)carbonyl]- guanidinhydrochlorid (3·HCl) _____	72
3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamin (6) _____	66
3-[(4-Chlorphenyl)imino]- <i>N</i> -isopropyl-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-5-amin (23) _____	81
3-Chlor-2,6-pyrazindiamin (8) _____	75
2,7-Diamino-6-chlor-4(3 <i>H</i>)-pteridinon (5) _____	78
3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (4) _____	73
<i>N</i> ''[(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]guanidin acetat (1·HOAc) _____	74
<i>N</i> -[(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]harnstoff (9) _____	76
Methyl-3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxylat (11) _____	77
<i>N</i> -(4-Oxo-3,4-dihydro-2-pteridinyl)acetamid (15) _____	79

5.4 Beschreibung der Substanzen

3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chlor-2,6-pyrazindiamin (6)



Darstellung: 0,2 g (0,66 mmol) **1·HCl** werden in 200 ml H₂O gelöst. Zu der Lösung werden 15,5 ml NaOH 8,5% und 11 ml Bromwasser R gegeben. Es entsteht eine grüngelb gefärbte Lösung, die bei 365 nm blau fluoresziert. Es wird mit Salzsäure 36% auf pH 3.2 eingestellt. Nach Zugabe von 25 ml Na₂S₂O₃-Lösung 0,1 mol/l wird 6 x mit 100 ml *t*-BuOMe ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit wenig CHCl₃ gewaschen und abgesaugt.

Ausbeute: 2 mg (1%)

Braune Kristalle, Schmp. (1) ab 295°C (Zers.) (DMF/H₂O)

¹H-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 6.26 (s,2H), 7.29 (s,4H)

¹³C-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 107.18 (C-3), 120.13 (C-5), 152.78 (C-6), 153.22 (C-2), 167.76 (C-3'), 170.43 (C-5')

MS (EI) : m/z (%) = 227 (100) [M]⁺, 171 (66)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3486 cm⁻¹, 3471, 3378, 3333, 3164 (N-H), 1661, 1624, 1603 (C=N, C=C)

UV (**Dioxan**) : $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 231 \text{ nm (3.77)}, 282 \text{ (4.15)}, 368 \text{ (4.27)}$

UV (**HCl 0.1 molar**) : $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 201 \text{ nm (4.46)}, 285 \text{ (3.71)}, 373 \text{ (3.79)}$

Fluoreszenz (**Dioxan / Anregungswellenlänge 368 nm**) : $\lambda_{\max} = 417 \text{ nm}$

Fluoreszenz (**HCl 0.1 molar / Anregungswellenlänge 373 nm**) : $\lambda_{\max} = 426 \text{ nm}$

HPLC (1) : $t_s = 1.47 \text{ min}$

C₆H₆ClN₇O :	Ber.	C 31.66	H 2.66	N 43.08
(227.6)	Gef.	C 31.60	H 2.69	N 42.41

Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	C ₆ H ₆ ClN ₇ O	
M_r	227.63	
Temperatur	133(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	monoklin	
Raumgruppe	P2 ₁ /c	
Gitterkonstanten	$a = 5.8398(4) \text{ Å}$	$a = 90^\circ$
	$b = 10.8565(8) \text{ Å}$	$\beta = 95.753(3)^\circ$
	$c = 13.4422(11) \text{ Å}$	$\gamma = 90^\circ$
Volumen, Z	847.94(11) Å ³ , 4	
Dichte (berechnet)	1.783 Mg/m ³	
Absorptionskoeffizient	0.434 mm ⁻¹	
F(000)	464	
Kristallgröße	0.43 x 0.23 x 0.10 mm ³	
θ –Bereich für die Datensammlung	1.45 bis 30.02°	
Limitierende Indizes	-8<= h <=8, -14<= k <=15, -18<= l <=18	

Zahl der Reflexe	15690
Unabhängige Reflexe	2477[R(int) = 0.0350]
Vollständigkeit bis $\theta = 30^\circ$	99.6%
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F^2
Daten/Einschränkungen/Parameter	2477/15/160
Goodness-of-fit on F^2	1.096
Final R-Indizes [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0283, wR2 = 0.0780
R-Indizes (alle Daten)	R1 = 0.0319, wR2 = 0.0805
Größte Differenzpeaks (Maximum und Minimum)	0.598 und $-0.200 \text{ e.}\text{\AA}^{-3}$

Atomkoordinaten [$\times 10^4$] und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter [$\text{\AA}^2 \times 10^3$]. U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalen U_{ij} Tensors.

	X	y	z	U(eq)
C	5112.7(4)	1488.1(2)	4685.2(2)	17.2(1)
O	1089.6(13)	3321.0(7)	7495.0(6)	16.1(2)
N(1)	7460.8(15)	4699.7(8)	5792.2(7)	13.7(2)
N(2)	3955.0(15)	3013.5(8)	6050.2(7)	14.0(2)
N(3)	6038.0(17)	6026.2(9)	6918.1(7)	17.2(2)
N(4)	8861.0(17)	3389.1(9)	4642.0(7)	16.2(2)
N(5)	-363.5(17)	3779.7(9)	8217.9(7)	17.6(2)
N(6)	2063.4(16)	5281.9(9)	7774.1(7)	15.8(2)
N(7)	-489.5(18)	5719.7(10)	9006.7(8)	19.5(2)
C(1)	5878.3(18)	4939.8(9)	6433.8(7)	13.1(2)
C(2)	4117.9(18)	4075.5(9)	6577.8(8)	13.7(2)

C(3)	5449.4(18)	2810.0(9)	5415.6(8)	13.7(2)
C(4)	7300.4(18)	3641.0(9)	5274.3(8)	13.1(2)
C(5)	2439.3(18)	4275.1(10)	7282.4(8)	14.0(2)
C(6)	331.0(18)	4929.8(10)	8342.9(8)	15.5(2)

Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °

Cl-C(3)	1.7388(11)	N(4)-C(4)	1.3353(13)
O-C(5)	1.3494(13)	N(5)-C(6)	1.3184(15)
O-N(5)	1.4415(11)	N(6)-C(5)	1.3073(14)
N(1)-C(4)	1.3422(13)	N(6)-C(6)	1.3817(14)
N(1)-C(1)	1.3512(13)	N(7)-C(6)	1.3590(14)
N(2)-C(3)	1.2989(13)	C(1)	1.4195(14)
N(2)-C(2)	1.3520(13)	C(2)-C(5)	1.4460(14)
N(3)-C(1)	1.3458(14)	C(3)-C(4)	1.4352(14)
C(5)-O-N(5)	105.86(8)	N(2)-C(3)-Cl	117.76(8)
C(4)-N(1)-C(1)	118.67(9)	C(4)-C(3)-Cl	119.22(8)
C(3)-N(2)-C(2)	118.23(9)	N(4)-C(4)-N(1)	119.27(9)
C(6)-N(5)-O	102.63(8)	N(4)-C(4)-C(3)	121.78(9)
C(5)-N(6)-C(6)	102.58(9)	N(1)	118.95(9)
N(3)-C(1)-N(1)	117.33(9)	N(6)-C(5)-O	113.80(9)
N(3)-C(1)-C(2)	121.97(9)	N(6)-C(5)-C(2)	128.00(9)

N(1)-C(1)-C(2)	120.70(9)	O-C(5)-C(2)	118.19(9)
N(2)-C(2)-C(1)	120.40(9)	N(5)-C(6)-N(7)	123.85(10)
N(2)-C(2)-C(5)	117.05(9)	N(5)-C(6)-N(6)	115.12(9)
C(1)-C(2)-C(5)	122.55(9)	N(7)-C(6)-N(6)	120.97(10)
N(2)-C(3)-C(4)	122.99(9)		

Torsionswinkel in °

C(5)-O-N(5)-C(6)	-0.61(11)	N(2)-C(3)-C(4)-N(1)	-2.45(16)
C(4)-N(1)-C(1)-N(3)	- 177.86(9)	Cl-C(3)-C(4)-N(1)	175.59(8)
C(4)-N(1)-C(1)-C(2)	1.68(15)	C(6)-N(6)-C(5)-O	-0.03(12)
C(3)-N(2)-C(2)-C(1)	0.17(15)	C(6)-N(6)-C(5)-C(2)	- 178.62(11)
C(3)-N(2)-C(2)-C(5)	- 179.70(9)	N(5)-O-C(5)-N(6)	0.41(12)
N(3)-C(1)-C(2)-N(2)	177.42(10)	N(5)-O-C(5)-C(2)	179.16(9)
N(1)-C(1)-C(2)-N(2)	-2.10(15)	N(2)-C(2)-C(5)-N(6)	- 170.30(10)
N(3)-C(1)-C(2)-C(5)	-2.72(16)	C(1)-C(2)-C(5)-N(6)	9.83(17)
N(1)-C(1)-C(2)-C(5)	177.76(10)	N(2)-C(2)-C(5)-O	11.15(14)
C(2)-N(2)-C(3)-C(4)	2.05(16)	C(1)-C(2)-C(5)-O	- 168.71(10)
C(2)-N(2)-C(3)-Cl	- 176.01(8)	O-N(5)-C(6)-N(7)	-176.62(10)
C(1)-N(1)-C(4)-N(4)	-179.61(9)	O-N(5)-C(6)-N(6)	0.66(12)
C(1)-N(1)-C(4)-C(3)	0.44(15)	C(5)-N(6)-C(6)-N(5)	-0.43(12)
N(2)-C(3)-C(4)-N(4)	177.61(10)	C(5)-N(6)-C(6)-N(7)	176.93(10)
Cl-C(3)-C(4)-N(4)	-4.35(14)		

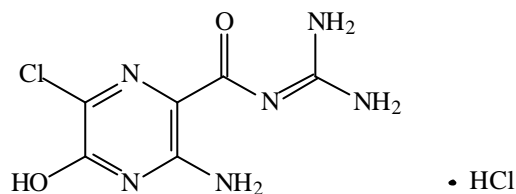
Wasserstoffbindungen in Å und °

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(3)-H(31)...O#1	0.852(13)	2.335(14)	3.0623(12)	143.5(15)
N(3)-H(32)...N(6)	0.859(12)	2.175(15)	2.8107(13)	130.6(14)
N(4)-H(41)...N(1)#2	0.862(13)	2.223(13)	3.0840(13)	177.0(15)
N(4)-H(42)...N(5)#3	0.845(13)	2.281(14)	3.0963(14)	162.3(17)
N(7)-H(71)...Cl#4	0.838(14)	2.836(18)	3.4683(10)	133.7(17)
N(7)-H(71)...Cl#5	0.838(14)	2.921(15)	3.6936(11)	154.2(18)
N(7)-H(72)...N(2)#4	0.860(12)	2.609(15)	3.2050(14)	127.4(14)

Benutzte Symmetrietransformationen für die Generierung äquivalenter Atome

#1 -x+1,y+1/2,-z+3/2
#2 -x+2,-y+1,-z+1
#3 x+1,-y+1/2,z-1/2
#4 -x,y+1/2,-z+3/2
#5 x-1,-y+1/2,z+1/2

***N*-[**(3-Amino-6-chlor-5-hydroxy-2-pyrazinyl)carbonyl**]guanidinhydrochlorid (**3·HCl**)**



Darstellung : 0,3 g (1 mmol) **1·HCl**-Dihydrat werden in 50 ml 1 mol/l HCl 24h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abfiltriert, mit EtOH abs. und Et₂O gewaschen.

Ausbeute: 230 mg (87 %)

Gelbes Pulver, Schmp. (1) > 350 °C, >300 °C ^[9]

¹H-NMR ([D₁₈] HMPT) : δ (ppm) = 8.30 (s,1H), 8.46 (s,1H), 9.40 (s,2H), 9.49 (s, 2H), 10.67 (s, NH),

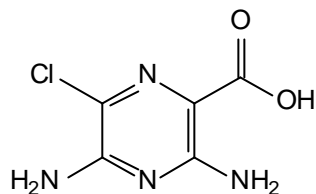
¹³C-NMR ([D₁₈] HMPT) : δ (ppm) = 103.48 (C-2), 129.71 (C-6), 153.26 (C-3), 157.48 (C-5,C-9), 166.3 (C-7)

MS (EI) : m/z (%) = 230 (25) [M]⁺, 213 (100)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3438 cm⁻¹, 3398, 3307, 3041 (OH, NH₂), 1676 (C=O), 1621, (C=N, C=C)

HPLC (2) : t_s = – 0.27 min

C₆H₇ClN₆O₂ · HCl :	Ber.	C 26.98	H 3.02	N 31.47
(267.1)	Gef.	C 26.96	H 2.92	N 31.01

3,5- Diamino-6-chlor-2-pyrazincarbonsäure (4)

Darstellung: 0,23g (1 mmol) **1** wird in 50 ml H₂O suspendiert. Es wird mit 4 mol/l NaOH auf pH 13,5 eingestellt und 7h bei 90 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird angesäuert, der Niederschlag abgesaugt und mit H₂O, wenig EtOH abs. und Et₂O gewaschen.

Ausbeute: 110 mg (57%)

Hellgelbes Pulver, Schmp. (2) 225 °C (DMSO/H₂O), 230-231°C, 272°C (DMSO/H₂O)^[10]

¹H-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 7.21 (s, 4H), 12.13 (s, OH)

¹³C-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 110.1(C-2), 118.7 (C-6), 153.2 (C-5), 155.9 (C-3), 167.3 (C-7),

MS (EI) : m/z (%) = 188 (100) [M]⁺, 144 (80)

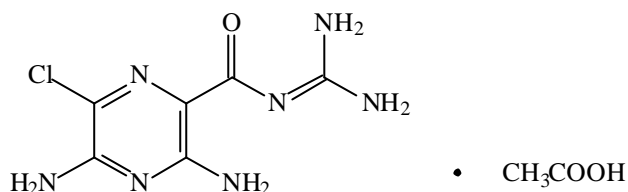
IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3619 cm⁻¹, 3415, 3317, 3167 (OH, NH₂), 1664 (C=O), 1618, 1559 (C=N, C=C)

UV (Dioxan) : λ_{\max} (lg ϵ) = 269 nm (4.11), 352 (4.08)

HPLC (2) : t_s = 0.05 min

C₅H₅ClN₄O₂ :	Ber. C 31.85	H 2.67	N 29.71
(188,6)	Gef. C 31.93	H 2.80	N 29.46

N'' [(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]guanidin acetat (1·HOAc)



Darstellung: 0,91 g (3 mmol) **1·HCl**-Dihydrat werden in 120 ml H₂O und 30 ml AcOH/AcONa-Puffer pH 4,6 unter Rückfluß 24 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wird vom Niederschlag (**1·HOAc**) abgetrennt. Die Lösung wird alkalisiert und 3 x mit 70 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und i. Vak. abgezogen. Der Rückstand enthält Verbindung **8**. Die wässrige Phase wird auf pH 6 eingestellt und 3x mit *tert*-BuOMe ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und abdestillieren i.Vak. erhält man Verbindung **9**.

Ausbeute : 160 mg (18%)

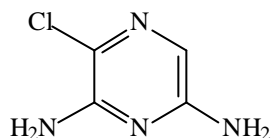
Braune Kristalle, Schmp. (1) ab 240 °C (Zers.)

MS (EI) : m/z (%) = 229(100) [M]⁺, 212 (20)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3400 cm⁻¹, 3337, 3060 (NH), 1708 (CO), 1667,1620 (C=N, C=C)

HPLC (2): t_s = – 0.08 min

C₆H₈ClN₇O · CH₃COOH: Ber.	C 33.17	H 4.18	N 33.85
(289,6)	Gef. C 33.08	H 4.17	N 33.61

3-Chlor-2,6-pyrazindiamin (8)

Darstellung : s. 1•HOAc

Ausbeute: 30 mg (7 %)

Gelbe Nadeln, Schmp. (2) 170°C (Toluol)

¹H-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 5.98 (s, NH₂), 6.07 (s, NH₂), 6.86 (s, 5-H)

¹³C-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 116.74 (C-3), 117.29 (C-5), 150.21 (C-2), 154.23 (C-6),

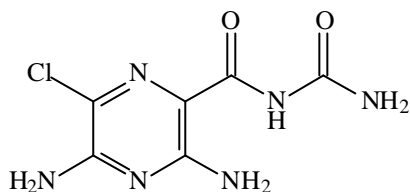
MS (EI) : m/z (%) = 144 (100) [M]⁺•, 117 (50)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3467 cm⁻¹, 3308, 3154 (NH₂, CH), 1644, 1614 (C=N, C=C)

HPLC (1) : t_s = 0.46

C₄H₅Cl N₄ :	Ber.	C 33.23	H 3.48	N 38.76
(144.5)	Gef.	C 33.77	H 3.38	N 37.57

***N*-[(3,5-Diamino-6-chlor-2-pyrazinyl)carbonyl]harnstoff (9)**



Darstellung : s. 1•HOAc

Ausbeute: 14 mg (2%)

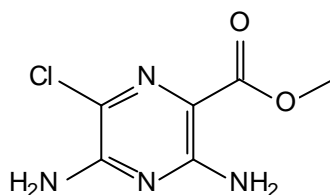
Schmp. (2) 240°C, 260 °C (MeOH)^[26]

¹H-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 7.33 (s, 5H), 7.68 (s, 1H), 8.84 (s, 1H),

¹³C-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 109.67(C-2), 118.68 (C-6), 152.95 (C-5), 153.93 (C-9),
155.37 (C-3), 164.92 (C-7)

MS (EI) : m/z (%) = 230(30) [M]⁺, 213 (100)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3466 cm⁻¹, 3328, 3153, 2923 (NH₂), 1727, 1671 (C=O), 1637, 1617 (C=N, C=C)

Methyl - 3,5-diamino-6-chlor-2-pyrazincarboxylat (11)

Darstellung: 0,23g (1mmol) **1** wird in einer Mischung aus 25 ml CHCl_3 und 25 ml MeOH 17 h unter Rückfluß erhitzt. Es wird 1 x mit 50ml Wasser, anschließend 4 x mit 50 ml CHCl_3 ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 120 mg (60%)

Gelbe Nadeln, Schmp.(2) 207°C (MeOH), $212\text{--}213^\circ\text{C}$ (MeCN) ^[9]

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO) : δ (ppm) = 3.73 (s, CH_3), 7.10 (s, 2H), 7.20 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO): δ (ppm) = 51.1 (C-8), 109.4 (C-2), 119.2 (C-6), 153.2 (C-5), 155.8 (C-3), 165.8 (C-7)

MS (EI) : m/z (%) = 202 (100) $[\text{M}]^{+\bullet}$, 144 (75)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3477 cm^{-1} , 3449, 3355, 3150 (N-H), 1669 (C=O), 1644, 1605 (C=N, C=C)

UV (Dioxan) : λ_{max} (lg ϵ) = 269 nm (4.19), 351 (4.16)

UV (HCl 0.1 molar) : λ_{max} (lg ϵ) = 272 nm (3.33), 355 (4.12)

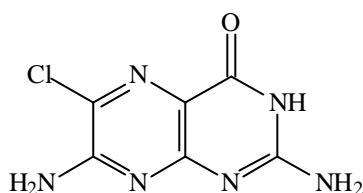
Fluoreszenz (Dioxan / Anregungswellenlänge 270 nm) : λ_{max} = 400 nm

Fluoreszenz (HCl 0.1 molar / Anregungswellenlänge 272 nm): λ_{max} = 418 nm

HPLC (1) : $t_s = 1.36$ min

C₆H₇ClN₄O₂ : Ber. C 35.57 H 3.48 N 27.65
(202,6) Gef. C 35.60 H 3.45 N 27.47

2,7-Diamino-6-chlor-4(3H)-pteridinon (5)



Darstellung : 0,3g (1mmol) **1·HCl**-Dihydrat werden in 20 ml DMF 8h unter Rückfluß gekocht. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit DMF, H₂O und MeOH gewaschen

Ausbeute : 40 mg (19 %)

Gelbes Pulver, Schmp. (1) > 350 °C

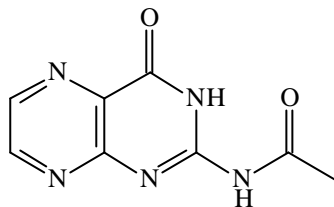
¹³C-NMR (CF₃COOD): δ (ppm) = 116.22 (C-6), 137.20 (C-4a), 149.67 (C-8a), 153.50 (C-2), 157.81 (C-4), 161.46 (C-7),

MS (EI) : m/z (%) = 212 (100) [M]⁺, 171 (55)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3412 cm⁻¹ (NH), 3359, 3150 (NH₂), 1690 (C=O), 1618 (C=N, C=C)

HPLC (1) : $t_s = 0.03$ min

C₆H₅ClN₆O : Ber. C 33.90 H 2.37 N 39.53
(212.6) Gef. C 33.03 H 2.30 N 35.91

***N*-(4-Oxo-3,4-dihydro-2-pteridiny)acetamid (15)**

Darstellung : 0,65g (4 mmol) 2-Amino-4(3*H*)-pteridinon werden in 40 ml Ac₂O 7h unter Rückfluß gekocht. Die Acetylverbindung kristallisiert beim Abkühlen aus. Es wird abfiltriert und mit H₂O, EtOH und Et₂O gewaschen.

Ausbeute : 0.44g (54%)

Beiges Pulver, Schmp. (2) ab 280°C (Zers.), 285 °C (Zers.) ^[32]

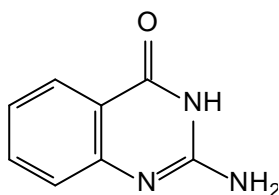
¹H-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 2.2 (s, CH₃), 8.6 (d, J = 2 Hz, CH), 8.8 (d, J = 2 Hz, CH), 11.9 (s, NH), 12.3 (s, NH)

¹³C-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 23.95 (CH₃), 131.94 (C-2,C-4a), 142.38 (C-6), 149.57 (C-8a), 150.26(C-7), 166.59 (CO), 174.19 (CO-CH₃),

MS (EI) : m/z (%) = 205(50) [M]⁺•, 163 (100)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3423cm⁻¹, 3178 (NH), 1720 (C=O), 1703 (CH₃-C=O), 1624 (C=N, C=C)

2-Amino - 4(3H)chinazolinon (20)



Darstellung: Eine Mischung aus 0,14g (1 mmol) Anthranilamid , 0,14g Chlorformamidinhydrochlorid (frisch hergestellt) und 0,17g DMSO₂ wird 1h im offenen Kolben bei 160°C erhitzt. H₂O wird hinzugefügt und weiter erwärmt. Anschließend wird mit Ammoniak 10% neutralisiert und abfiltriert.

Ausbeute: 60 mg (37%)

Hellgelbes Pulver, Schmp.(2) > 300°C, > 400°C (DMF) ^[37]

¹H-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 6.68 (s, NH₂), 7.13 (t, J = 7 Hz, 6-H), 7.23 (d, J = 8Hz, 8-H), 7.58 (t, J = 7Hz, 7-H), 7.92 (d, J = 7Hz, 5-H), 11.33 (s, NH)

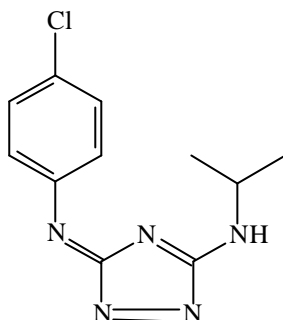
¹³C-NMR ([D₆] DMSO) : δ (ppm) = 115.79 (C-4a), 117.96 (C-8), 124.19 (C-6), 126.67 (C-5), 135.44 (C-7), 140.91 (C-8a), 151.65 (C-2), 160.62 (C-4)

MS (EI) : m/z (%) = 161 (100) [M]⁺, 119 (60)

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3403 cm⁻¹ (NH), 3149, 3061 (NH₂), 1687 (C=O), 1654, 1609 (C=N, C=C)

HPLC (I) : t_s = 1.68 min

C₈H₇N₃O:	Ber.	C 59.62	H 4.38	N 26.07
(161.2)	Gef.	C 59.24	H 4.53	N 26.13

(3E)-3-[(4-Chlorphenyl)imino]-N-isopropyl-3H-1,2,4-triazol-5-amin (23)

Darstellung: 0,12 g (0,47 mmol) Proguanilhydrochlorid werden in 80 ml methanolischer KOH (2 mol/l) gelöst. Zu der Lösung werden 3,4 ml Bromwasser R gegeben. Es entsteht eine blutrot gefärbte Lösung. Nach Abdestillieren des MeOH werden 50 ml H₂O hinzugefügt und 2x mit 50 ml Toluol ausgeschüttelt. Die organische Phase wird verworfen. Anschließend wird 4x mit 80 ml *t*-BuOMe ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum eingengt und mittels Flash-Chromatographie unter Verwendung von Petroläther/EtOAc (2:1) als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (4 %)

Rote Nadeln, Schmp. (2) 120°C (EtOAc/Petroläther)

¹H-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) = 1.46 (d, 6H, J = 6, CH₃), 4.25 (sept, 1H, J = 6 Hz, CH), 7.41 (d, J = 9 Hz, 2-H, 6-H), 7.92 (d, J = 9 Hz, 3-H, 5-H),

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ (ppm) = 22.23 (C-4,C-5), 47.40 (C-3), 128.79 (C-12,C-16,C-14), 129.24 (C-13,C-15), 133.04 (C-2), 134.63 (C-11), 173.48 (C-1)

MS (EI) : m/z (%) = 251 (25) [M+2 H]⁺, 152 (100)

MS (ESI): negativ: m/z = 248 [M-H]⁻

MS (ESI): positiv: m/z = 272, [M+Na]⁺, 521 [2 x M + Na]⁺

IR (KBr) : $\tilde{\nu}$ = 3434 cm⁻¹, 3190 (NH), 3055, 2952 (CH), 1693, 1607 (C=N, C=C)

UV (**Dioxan**) : $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 415 \text{ nm (4.13)}$

HPLC (3) : $t_s = 0.57$

C₁₁H₁₂ClN₅:	Ber.	C 52.91	H 4.84	N 28.05
(251.7)	Gef.	C 52.62	H 4.82	N 27.73

Präzisionsmasse [M+ Na] : Ber. 272.067
Gef. 272.067

Kristalldaten und Strukturverfeinerung

Summenformel	C ₁₁ H ₁₂ ClN ₅
Mr	249.71
Temperatur	133(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Triclinic
Raumgruppe	P(-1)
Gitterkonstanten	a = 4.7149(12) Å ? = 71.171(6)° b = 11.002(3) Å ? = 81.901(9)° c = 11.699(3) Å ? = 87.970(9)°
Volumen	568.6(3) Å ³
Z	2
Dichte (berechnet)	1.458 Mg/m ³
Absorptionskoeffizient	0.320 mm ⁻¹
F(000) 260	
Kristallgröße	0.5 x 0.2 x 0.1 mm ³
? –Bereich für die Datensammlung	1.86 to 30.03°
Limitierende Indizes	-6<=h<=6, -15<=k<=15, -16<=l<=16
Zahl der Reflexe	6601
Unabhängige Reflexe	3277 [R(int) = 0.1090]
Vollständigkeit bis ? = 30.00°	98.2 %
Absorptionskorrektur	Keine
Verfeinerungsmethode	Full-matrix least-squares on F ²
Daten/Einschränkungen/Parameter	3277 / 0 / 158
Goodness-of-fit on F ²	1.041
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0452, wR2 = 0.1231
R indices (alle Daten)	R1 = 0.0549, wR2 = 0.1305
Größte Differenzpeaks	0.603 and -0.296 e.Å ⁻³

Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

U(eq) ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalen Uij Tensors.

	x	y	z	U(eq)
Cl	-3489.0(8)	9212.3(3)	3602.8(3)	23.9(1)
N(1)	4352(3)	5685.3(12)	6518.6(11)	18.4(2)
N(2)	7399(3)	4750.5(12)	7924.4(11)	19.6(3)
N(3)	8301(3)	4990.2(12)	8787.5(11)	18.8(3)
N(4)	5087(3)	6587.6(11)	8103.4(10)	18.5(3)
N(5)	7562(3)	6596.7(12)	9717.9(11)	19.4(3)
C(1)	5383(3)	5747.8(13)	7448.7(12)	17.2(3)
C(2)	6863(3)	6144.9(14)	8889.4(12)	18.0(3)
C(3)	6520(3)	7806.9(15)	9862.6(13)	22.4(3)
C(4)	7214(4)	7853.8(16)	11067.8(14)	28.5(3)
C(5)	7846(4)	8918.3(16)	8805.2(15)	32.7(4)
C(11)	2466(3)	6570.1(13)	5893.5(12)	17.2(3)
C(12)	1853(3)	6385.9(14)	4832.0(13)	19.8(3)
C(13)	26(3)	7189.5(14)	4123.2(13)	21.1(3)
C(14)	-1219(3)	8178.3(14)	4488.0(12)	18.2(3)
C(15)	-676(3)	8375.8(14)	5542.0(12)	19.1(3)
C(16)	1180(3)	7579.4(13)	6242.0(12)	18.2(3)

Bindungslängen [Å] und Bindungswinkel [°]

Cl-C(14)	1.7254(14)	C(1)-N(1)-C(11)	124.61(12)
N(1)-C(1)	1.2748(17)	N(3)-N(2)-C(1)	106.90(11)
N(1)-C(11)	1.3912(17)	N(2)-N(3)-C(2)	106.45(11)
N(2)-N(3)	1.2534(16)	C(2)-N(4)-C(1)	102.78(11)
N(2)-C(1)	1.4484(17)	C(2)-N(5)-C(3)	123.70(12)
N(3)-C(2)	1.4499(17)	N(1)-C(1)-N(4)	134.18(13)
N(4)-C(2)	1.2974(17)	N(1)-C(1)-N(2)	115.21(12)
N(4)-C(1)	1.3701(17)	N(4)-C(1)-N(2)	110.58(11)
N(5)-C(2)	1.3068(18)	N(4)-C(2)-N(5)	129.86(13)
N(5)-C(3)	1.4554(18)	N(4)-C(2)-N(3)	113.27(12)
C(3)-C(4)	1.509(2)	N(5)-C(2)-N(3)	116.85(12)
C(3)-C(5)	1.509(2)	N(5)-C(3)-C(4)	108.05(12)
C(11)-C(12)	1.3909(18)	N(5)-C(3)-C(5)	110.13(13)
C(11)-C(16)	1.3935(19)	C(4)-C(3)-C(5)	112.16(14)
C(12)-C(13)	1.3730(19)	C(12)-C(11)-N(1)	114.66(12)
C(13)-C(14)	1.376(2)	C(12)-C(11)-C(16)	119.19(12)
C(14)-C(15)	1.3782(19)	N(1)-C(11)-C(16)	126.14(12)
C(15)-C(16)	1.3741(19)	C(13)-C(12)-C(11)	120.92(12)
		C(12)-C(13)-C(14)	118.77(13)
		C(13)-C(14)-C(15)	121.60(12)
		C(13)-C(14)-Cl	119.61(11)
		C(15)-C(14)-Cl	118.79(11)
		C(16)-C(15)-C(14)	119.51(12)
		C(15)-C(16)-C(11)	120.01(13)

Torsionswinkel [°]

C(1)-N(2)-N(3)-C(2)	0.40(15)	C(2)-N(5)-C(3)-C(5)	-70.10(19)
C(11)-N(1)-C(1)-N(4)	0.0(3)	C(1)-N(1)-C(11)-C(12)	173.62(14)
C(11)-N(1)-C(1)-N(2)	-177.60(13)	C(1)-N(1)-C(11)-C(16)	-6.9(2)
C(2)-N(4)-C(1)-N(1)	-175.92(17)	N(1)-C(11)-C(12)-C(13)	-179.91(14)
C(2)-N(4)-C(1)-N(2)	1.72(15)	C(16)-C(11)-C(12)-C(13)	0.6(2)
N(3)-N(2)-C(1)-N(1)	176.76(13)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-0.7(2)
N(3)-N(2)-C(1)-N(4)	-1.37(16)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	0.0(2)
C(1)-N(4)-C(2)-N(5)	176.85(15)	C(12)-C(13)-C(14)-C1	179.23(12)
C(1)-N(4)-C(2)-N(3)	-1.50(16)	C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	0.8(2)
C(3)-N(5)-C(2)-N(4)	-4.2(3)	C1-C(14)-C(15)-C(16)	-178.47(12)
C(3)-N(5)-C(2)-N(3)	174.12(13)	C(14)-C(15)-C(16)-C(11)	-0.9(2)
N(2)-N(3)-C(2)-N(4)	0.73(17)	C(12)-C(11)-C(16)-C(15)	0.2(2)
N(2)-N(3)-C(2)-N(5)	-177.86(13)	N(1)-C(11)-C(16)-C(15)	-179.25(14)
C(2)-N(5)-C(3)-C(4)	167.08(14)		

Wasserstoffbindungen [Å und °]

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(5)-H(05)...N(3)#1	0.75(2)	2.19(2)	2.9426(18)	179(2)

Benutzte Symmetrietransformationen für die generierung äquivalenter Atome:

#1 -x+2,-y+1,-z+2

6 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure
Ber.	Berechnet
CDCl ₃	Deuterochloroform
CF ₃ COOD	Deuterotrifluoressigsäure
CH ₂ O	Formaldehyd
CNDO	Complete Neglect of Differential Overlap
COLOC	Correlation Spectroscopy via Long Range Couplings
Cu(OAc) ₂	Kupferacetat
DC	Dünnschichtchromatographie
dc	dünnschichtchromatographisch
[D ₆]DMSO	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
[D ₁₈]HMPA	Octadecadeuterohexamethylphosphorsäuretriamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO ₂	Dimethylsulfon
D ₂ O	Deuteriumoxid
EtI	Ethyljodid
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
EtONa	Natriumethanolat
FC	Flashchromatographie
fc	flashchromatographisch
FM	Fließmittel
Gef.	Gefunden
HCOOH	Ameisensäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivities

HOAc	Essigsäure
<i>i</i> PrOH	Isopropylalkohol
J	Kopplungskonstante
KBr	Kaliumbromid
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
Mw	Mikrowelle
m/z	Masse pro Ladungseinheit
<i>n</i> -BuOH	Butanol
NaNO ₂	Natriumnitrit
NaOAc	Natriumacetat
NaOC ₂ H ₅	Natriumethanolat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
Na ₂ S ₂ O ₄	Natriumdithionit
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
R _f	Retentionsfaktor
Schmp.	Schmelzpunkt
SO ₂ Cl ₂	Sulfurylchlorid
<i>t</i> -BuOK	Kalium-tertiär-butylat
<i>tert</i> -BuOMe	tertiär-Butylmethylether
THF	Tetrahydrofuran
Zers.	Zersetzung

- 88

-
- [13] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Aufl., **1991**, 162
- [14] J.W.H. Watthey, M. Desai, R. Rutledge, R. Dotson, Synthesis and Diuretic Profile of 3-(3-Amino-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-5-chloro-2,6-pyrazinediamine, an Amiloride-Type Diuretic, *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 690-692
- [15] J. Lessel, Benzodiazepine und Isoindole durch Acylierung von Amidinen, *Pharmazie* **1993**, 48, 812-816
- [16] G.M. Shutske, M.N. Agnew, ^{13}C -NMR Spectra of Anhydro-3-mercapto-5-pyrazinyl-1,2,4-triazolium Hydroxides, *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, 18, 1025-1028
- [17] M.G. Bock, R.L. Smith, E.H. Blaine, E.J. Cragoe, Jr., Synthesis and Biological Activity of 3-Amino-5(3,5-diamino-6-chloropyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazole: An Amiloride Prodrug, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1540-1544
- [18] R.G.W. Spickett, G.M. Timmis, The Synthesis of Compounds with Potential Anti-folic Acid Activity, Part I, 7-Amino- and 7-Hydroxy-pteridines, *J. Chem Soc.* **1954**, Part III., 2887-2895
- [19] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Aufl., **1991**, 739
- [20] S.A. Heininger, Cupric Acetate Catalyzed Monocyanoethylation of Aromatic Amines, *J. Org. Chem.* **1957**, 22, 1213-1217
- [21] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Aufl., **1991**, 706
- [22] L.F. Miller, R.E. Bambury, 1-Substituted 2,5-Dimethylpyrroles, *J. Med. Chem.* **1970**, 13, 1022-1023
- [23] M.G. Bock, H.B. Schlegel, G.M. Smith, Theoretical Estimation of pKa Values of Pyrazinylguanidine Derivatives, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 1925-1927
- [24] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York, 5. überarbeitete Aufl., **1995**, 158
- [25] M.J. Chapdelaine, P.J. Warwick, A. Shaw, An Efficient Method for Preparation of 3,5-Diamino-6-chloropyrazin-2-yl Alkylketones Using a Novel Acetylene Hydration Method, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1218-1221

- [26] J.W. Hanifin, R. Capuzzi, E. Cohen, The preparation of Substituted N-Carbamoylpyrazinecarboxamides, *J. Med. Chem.* **1969**, *12*, 1102-1103
- [27] ACD/CNMR Predictor, Release 7.00, Product Version 7.07
- [28] S. Tobias, H. Günther, W. Pfeleiderer, Pteridin-Spektren IV, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 354-362
- [29] U. Ewers, H. Günther, L. Jaenicke, Pteridin-Spektren, III, *Chem. Ber.* **1974**, *107*, 3275-3286
- [30] W. Massefski, Jr., A. Redfield, U. Das Sarma, A. Bannerji, S. Roy, [7-¹⁵N]Guanosine-Labeled Oligonucleotides as Nuclear Magnetic Resonance Probes for Protein-Nucleic Acid interaction in the Major Groove, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5350-5351
- [31] J.H. Mowat, J.H. Boother, B.L. Hutchings, E.L.R. Stokstad, C.W. Waller, R.B. Angier, J. Semb, D.B. Cosulich, Y. Subbarow, The Structure of the Liver L. casei Factor, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 14-18
- [32] M. Viscontini, H.R. Weilenmann, Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*; Chemische Eigenschaften des 2-Amino-6-hydroxy-pteridins, *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 2170-2177
- [33] V.P. Williams, J.E. Ayling, Mass Spectral Analysis of Substituted Pteridines and Their Reduces Analogs, *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 827-833
- [34] A. Dieffenbacher, R. Mondelli, W.v. Philipsborn, Protonenresonanzspektren von Pteridinen V; 2-Amino-4-oxo-3,4-dihydropteridine, *Helv. Chim. Acta* **1966**, *49*, 1355-1376
- [35] S.W. Schneller, A.C. Ibay, Synthesis of proximal-Benzoguanine and a Simplified Synthesis of proximal-Benzohypoxanthine, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4067-4070
- [36] M. Kuhn, R. Mecke, IR-Spektroskopische Strukturuntersuchungen über Addukte aus Cyanamid und Halogenwasserstoff, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3016-3027
- [37] H.-J. Hess, T.H. Cronin, A. Scriabine, Antihypertensive 2-Amino-4(3*H*)-quinazolinones, *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 130-136
- [38] P.J. Garratt, C.J. Hobbs, R. Wigglesworth, One-Carbon Compounds as Synthetic Intermediates. The Synthesis of Hydropyrimidines and Hydroquinazolines by Sequential Nucleophilic Addition to Diphenyl Cyanocarbonimidate with Concomitant Cyclization, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1062-1069

-
- [39] M. Hilp, Colour reaction of PH. EUR. for identification of drugs using 1,3-dibromo-5,5-dimethylhydantoin (DBH) instead of elemental bromine, *Pharmazie*, **2002**, 57, 172-175
- [40] F.H.S. Curd, D.G. Davey, D.N. Richardson, R.B. Ashworth, Synthetic Antimalarials. Part XLIII. Some Dithiobiurets and 1,2,4-Triazoles related to Paludrine, *J. Chem Soc.* **1949**, 1739-1745
- [41] F. Arndt, Über einige Triazole, *Chem. Ber.* **1922**, 55, 12-18
- [42] E.A. Steck, F.C. Nachod, Absorption Spectra of Heterocycles. VIII. Some Guanazole Derivates, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4411-4414
- [43] E.A. Steck, R.P. Brundage, L.T. Fletcher, Some Guanazole Derivates, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3929-3931
- [44] A. Heesing, K. Hoppe, Sakaguchi- und Fearon-Reaktion: Die Struktur der Farbstoffe, ihr Bildungsmechanismus und die Spezifität der Reaktion, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 3649-3654
- [45] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York, 5. überarbeitete Aufl., **1995**, 47
- [46] G. T. Dobрева, Phosphor-Analoga von Indoxyl, Indigo und Hemiindigo-Farbstoffen, *Dissertation* **2002**, 26-30, Technische Universität Braunschweig
- [47] F. Arndt, F. Tschenscher, Über die inneren Azoverbindungen von Azolen, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1984-1988

Lebenslauf

Name	Silke Huth
Geburtstag	21.08.1971 in Wolfsburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	1978-1980 Grundschule Radenbeck 1980-1982 Grundschule Ohrdorf 1982-1984 Orientierungsstufe Wittingen 1984-1991 Gymnasium Hankensbüttel
Allgemeine Hochschulreife	Mai 1991
Zwischentätigkeit	1991-1992 Firma Wiesensee KG, Radenbeck Bürohilfskraft
Pharmaziestudium	1992-1998 an der Technischen Universität Braunschweig, während des Studiums insgesamt 7 Monate studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig
Pharmaziepraktikum	Juni 1998-Nov. 1998 Apotheke des Städtischen Klinikums, Braunschweig Dez. 1998- Mai 1999 Hagenmarkt - Apotheke, Braunschweig
Approbation	Juni 1999
Berufliche Tätigkeit	Juli 1999-April 2000 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braun- schweig Mai 2000- Mai 2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin ebenda, Betreuung des Praktikums Pharmazeutische Chemie III, Toxikologie und Arzneimittel- Untersuchungen
Berufliche Weiterbildung	Juli 2003 Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik



„Er sagt, nach sieben Halben sei ihm nicht so gut, ob wir mal die Rheinheit prüfen könnten!“